

Uso de culturas primárias de hepatócitos de robalo
(*Dicentrarchus labrax*) para avaliação de efeitos
toxicológicos de poluentes

Pedro Miguel Gouveia Santos

Dissertação de mestrado em Contaminação e Toxicologia
Ambientais

2011

Pedro Miguel Gouveia Santos

Uso de culturas primárias de hepatócitos de robalo
(Dicentrarchus labrax) para avaliação de efeitos toxicológicos
de poluentes.

Dissertação de Candidatura ao grau de
Mestre em Contaminação e Toxicologia
Ambientais submetida ao Instituto de
Ciências Biomédicas de Abel Salazar da
Universidade do Porto.

Orientador – Doutora Marta Ferreira
Categoria – Investigadora Auxiliar no
Laboratório de Toxicologia Ambiental do
Centro Interdisciplinar de Investigação
Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Co-orientador – Professora Doutora Maria
Armanda Reis Henriques
Categoria – Professora Catedrática
Afiliação – Instituto de Ciências
Biomédicas Abel Salazar da Universidade do
Porto (ICBAS) e Centro Interdisciplinar de
Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação de mestrado só foi possível graças ao contributo de várias pessoas que, de uma forma ou de outra, me ajudaram na elaboração da mesma, e tentarei transmitir por palavras o quão grato estou por todo o apoio.

Agradeço à Doutora Marta Ferreira e Professora Doutora Maria Armanda Reis-Henrique por todo o apoio e orientação prestada ao longo do tempo que estive no Laboratório de Toxicologia Ambiental. Por toda a dedicação e profissionalismo demonstrado, o meu muito obrigado. Agradeço igualmente a todo o pessoal do laboratório pela amizade, simpatia, bom-humor e ajuda que me deram ao longo deste tempo.

Aos Professores Doutores Vitor Vasconcelos e Lúcia Guilhermino, directores e orgulhosos “pais” deste mestrado, pela entrega e interesse que sempre demonstraram pelos alunos.

Um obrigado aos meus “compinchas” de mestrado, alguns já conhecidos dos tempos de licenciatura, e outros cuja amizade mais recente não deixa de ser valiosa. A todos os amigos que, mesmo só me vendo de 3/3 ou de 6/6 meses ainda se lembram de mim. Um “bjiiii” à Leonor, um abraço ao Ricardo, um “hell yeah” ao Zé e um “yo” ao Freitas, pelos convites trimensais ao café, pelas idas a Aveiro e visitas à hora do almoço que muito bem me fizeram.

Obrigado, pai e mãe, por tudo. Pelas palavras, carinho, e educação que me deram, e que a longo prazo se orgulhem do “caçula”. À minha irmã Paula e seus dois filhos, Bruno e Bruna, por animarem a casa (sim, os berros, gritinhos e corridas contam como animação). À mana Joana, por me aturar constantemente, 24/7 (coitada!), por me ouvir e dar-me conselhos que guardarei para o resto da vida (ou até me chegar o Alzheimer). Ah, e não posso deixar de reconhecer a companhia que os meus cães, Mike, Mel e Amber, e desculpem não ir passear

com vocês tantas vezes como devido... Uma festa à Kika, que partiu antes do seu tempo...

À equipa Maximus, por ensinarem a nunca desistir e a puxar mais um pouco por mim próprio, mesmo nos momentos em que a força é fraca e parece já não existir.

À Nadia. Agradeço-te todo o apoio, companhia, carinho que me deste ao longo deste período tribulado, e pela paciência que tiveste comigo. Nunca tenho palavras para dizer o quão importante és para mim, e nunca vou saber transmitir por o quanto estou grato por te ter ao meu lado.

A todos os robalos que foram utilizados, agradeço a vossa colaboração...

“The important thing is not to stop questioning;
curiosity has its own reason for existing.”

Albert Einstein

Resumo

Quando sujeitos a condições adversas, como a presença de contaminantes, os organismos aquáticos como os peixes necessitam de mecanismos de destoxificação que os eliminem. Os poluentes são metabolizados numa fase I de biotransformação após entrada na célula, sendo posteriormente conjugados numa fase II de biotransformação. As proteínas transmembranares *ATP-binding cassette* (ABC), são responsáveis pelo efluxo dos poluentes antes e/ou depois das fases I e II de biotransformação, estando por isso associadas às fases 0/III da destoxificação. Considerando a relevância do fígado enquanto órgão de destoxificação e de adaptação às condições ambientais, as culturas primárias de hepatócitos de peixes têm sido usadas como modelos *in vitro* na avaliação de efeitos tóxicos de poluentes presentes no meio aquático. No entanto, a grande maioria dos estudos tem aplicado culturas primárias de células de peixes de água doce, existindo uma grande lacuna na aplicação de culturas primárias de hepatócitos de espécies marinhas no contexto ecotoxicológico.

Neste trabalho pretendeu-se testar as culturas primárias de hepatócitos de robalo (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeu 1758) como um possível modelo *in vitro* na avaliação de efeitos toxicológicos de poluentes, tendo-se utilizado como contaminante modelo o benzo(a)pireno (BaP) medindo os efeitos ao nível dos mecanismos de destoxificação. Os hepatócitos foram isolados e cultivados em placas de 24 poços e após exposição das células durante 24 h ao BaP avaliou-se a actividade enzimática das fases I e II de biotransformação, e os níveis de expressão génica do CYP1A e dos transportadores ABCC1-2. A funcionalidade dos transportadores nas culturas foi determinada pelo ensaio de actividade dos transportadores ABC, através da medição da acumulação intracelular do substrato Rodamina 123 (Rh123), na presença ou ausência de inibidores específicos dos transportadores.

Após a exposição ao BaP verificou-se um aumento significativo da expressão génica do transportador ABCC2 e do CYP1A. Relativamente à actividade enzimática das fases I e II de biotransformação, verificou-se indução da actividade da etoxiresorufina-o-deetilase (EROD) num padrão dose-resposta, e indução da actividade da glutathiona-s-transferase (GST) na concentração mais elevada de BaP. Com a realização do ensaio de actividade dos transportadores ABC foi possível mostrar a sua funcionalidade nas culturas primárias de hepatócitos de robalo. No entanto, não foi possível determinar quais os transportadores predominantes nas culturas. Verificou-se que a actividade da EROD e da GST estavam correlacionadas com a expressão génica dos transportadores ABCC1-2, o que pode reforçar a ideia de interacção entre as fases I e II de biotransformação, e estes transportadores de efluxo.

A realização deste trabalho permitiu verificar que os hepatócitos de robalo, ao manterem funcionais as enzimas das fases I e II de biotransformação e dos transportadores ABC, poderão ser usados como ferramenta ecotoxicológica, tendo sido possível avaliar os efeitos do BaP nas diversas fases de destoxificação. Os resultados obtidos reforçam também a ideia da possível cooperação entre as fases I e II de biotransformação, e os transportadores ABC das fases 0/III.

Palavras-chave: Culturas primárias; hepatócitos; BaP; EROD; GST; MXR

Abstract

When subjected to adverse conditions, such as the presence of contaminants, aquatic organisms, like fish, use detoxification mechanisms in order to eliminate them. Pollutants are metabolized by phase I of biotransformation after entering the cell, and are further conjugated by phase II of biotransformation. ATP-binding cassette (ABC) transmembrane proteins are responsible for the efflux of pollutants before and/or after biotransformation phase I and II, and are therefore associated with phase 0/III of the detoxification mechanism. Considering liver's role as the major organ in detoxification and adaptation to environmental conditions, primary cultured hepatocytes have been used as in vitro models to evaluate toxic effects of pollutants present in the aquatic environment. However, most studies use primary cultures cells from freshwater species, and there is a lack of studies using marine species hepatocytes in ecotoxicological studies.

In this study we intended to assess seabass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) primary cultured hepatocytes as a possible tool for evaluating the toxicological effects of pollutants, using benzo(a)pyrene (BaP) as the model contaminant, by measuring the effects on the detoxification mechanisms. Hepatocytes were isolated and cultivated in 24 well plates, and after a 24 h exposure to BaP, phase I and II enzymatic activities, and CYP1A and ABCC1–2 transporters gene expression were measured. ABC transporters functionality was assessed by ABC transporters activity assay, measuring the levels of hepatocytes intracellular accumulation of the substrate rhodamine 123 (Rh123), in the presence or absence of specific ABC transporters inhibitors.

After exposing the cells to the contaminant, a significant increase in ABCC2 and CYP1A gene expression was observed. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity was induced in a dose-response manner, and glutathione S-transferase (GST) activity was induced only at the highest BaP concentration. The functionality

of ABC transporters in seabass primary hepatocytes was demonstrated, however it was not possible to be determined which type of transporter was predominant. A correlation between EROD and GST activity, and ABCC1–2 gene expression was observed, reinforcing the idea of the possible cooperation between biotransformation phases I and II, and ABC transporters.

With this study it was possible to show that European seabass primary hepatocytes maintain the functionality of phase I and II biotransformation enzymes and ABC transporters, and that it can be used as a potential ecotoxicological tool in environmental toxicology. Moreover, the results obtained also reinforce the idea of a possible cooperation between biotransformation phases I and II, and phases 0/III ABC transporters.

Keywords: Primary cultures; hepatocytes; BaP; EROD; GST; MXR

Índice	Página
Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	vi
Índice	vii
Índice de figuras e tabelas	x
1. Introdução	1
1.1 Destoxificação	2
1.1.1 Fase I de biotransformação	2
1.1.2 Fase II de biotransformação	4
1.1.3 Fase 0/III de destoxificação	5
1.2 Culturas primárias	9
1.3 Organismo modelo	10
1.4 Objectivos	11
2. Materiais e métodos	12
2.1 Manutenção dos robalos	12
2.2 Isolamento dos hepatócitos	12
2.3 Exposição a Benzo(a)Pireno	13
2.4 Extracção de RNA e síntese de cDNA	13
2.5 Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT–PCR)	14
2.6 Avaliação da actividade enzimática	17
2.7 Avaliação da actividade dos transportadores ABC	18
2.8 Avaliação da viabilidade celular	19
2.9 Análise estatística	20
2.10 Declaração de ética	20

3. Resultados	21
3.1 Expressão génica	21
3.2 Actividade enzimática	23
3.3 Actividade dos transportadores ABC	25
3.4 Viabilidade celular	26
4. Discussão	28
5. Conclusão	36
6. Referências	38

Índice de figuras e tabelas	Página
Figura 1 – Mecanismo de indução do CYP por exposição a PAHs.	3
Figura 2 – Esquema de transportadores membranares ABC.	7
Figura 3 – Integração das fases 0 (Pgp), I (CYP1A), II (GST) e III (MRP) na destoxificação.	8
Figura 4 – Expressão do mRNA dos genes de referência EF1, 18S e L17 em relação controle.	21
Figura 5 – Expressão normalizada do mRNA dos genes dos transportadores ABCC1–2.	22
Figura 6 – Expressão normalizada do mRNA do gene do CYP1A.	23
Figura 7 – Actividade da EROD nos hepatócitos após exposição a BaP.	24
Figura 8 – Actividade da GST nos hepatócitos após exposição a BaP.	24
Figura 9 – Acumulação de Rh123 intracelular após incubação com os inibidores MK571 e CycA.	25
Figura 10 – Acumulação de Rh123 intracelular após incubação BaP.	26
Figura 11 – Viabilidade celular após incubação com os inibidores MK571 e CycA.	27
Figura 12 – Viabilidade celular após incubação com BaP.	27
Tabela 1 – Número de acesso, sequência, concentração, eficiência e tamanho do fragmento para cada par de <i>primers</i> utilizados dos genes de estudo.	15

1. Introdução

Ao longo do século XX, a actividade humana levou ao aumento dos níveis de poluição nos ecossistemas, entre os quais o meio aquático. O tráfego ao longo dos rios e nos mares, assim como a crescente urbanização das zonas costeiras, levaram ao aumento dos níveis de diversos poluentes a nível global. A presença de compostos como bifenis policlorados (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), pesticidas como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), entre outros, tem sido monitorizada em diversas massas de água, estando presentes em rios, estuários e ao longo da costa marítima portuguesa (Antunes & Gil, 2004; Bebianno & Barreira, 2009; Ferreira et al., 2010; Nunes et al., 2011), assim como em todos os ecossistemas do planeta.

Os PAHs são resultantes da combustão incompleta de substâncias orgânicas e, embora possam ter origem natural (ex: incêndios, erupções vulcânicas), a maioria são de origem antropogénica (emissões de veículos, derrames de petróleo, entre outros) (Latimer & Zheng, 2003). Na sua estrutura apresentam pelo menos dois anéis aromáticos de benzeno (Pazos et al., 2010) e são um dos contaminantes ambientais com maior predominância nas zonas costeiras (Meador et al., 1995). Entre estes compostos destaca-se o Benzo(a)Pireno (BaP), um PAH formado por cinco anéis de benzeno, e um dos poluentes prioritários na monitorização do meio aquático pela União Europeia (Decisão nº2455/2001/CE) e também classificado como um dos PAHs prioritários em avaliação de risco pela Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), devido à sua toxicidade e potencial carcinogénico (Buhler & Williams, 1989; Tsukatani et al., 2003).

Para sobreviverem em ambientes poluídos os organismos adaptam-se, necessitando da participação e interacção de diversos mecanismos de destoxificação. Numa primeira linha de defesa o poluente é efluxado, sem transformação, por proteínas transmembranares (fase 0), podendo o mesmo tipo

de proteínas efectuar o efluxo de metabolitos resultantes das fases I e II de biotransformação (fase III). Após a entrada na célula, os poluentes são metabolizados via fase I de biotransformação, e embora alguns tipos de metabolitos possam ser directamente excretados, são na maioria conjugados por enzimas da fase II (van der Oost et al., 2003).

1.1 – Destoxificação

1.1.1 – Fase I de biotransformação

Na fase I ocorrem reacções de oxidação, redução e hidrólise que são catalisadas por enzimas monoxigenases microssomais (MO), sendo a maior parte destas reacções, nos peixes, dependentes do citocromo P450 (CytP450 ou CYP1A) (Goksøyr & Förlin, 1992). A biotransformação é um passo necessário para a eliminação e excreção de poluentes, no entanto na metabolização de certos compostos ocorrem fenómenos de bioactivação nos quais os metabolitos resultantes são mais tóxicos que o composto original (Buhler & Wang-Buhler, 1998; van der Oost et al., 2003). Um dos metabolitos do BaP, o BaP-7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido, apresenta elevado potencial carcinogénico devido à sua capacidade de se ligar a macromoléculas como DNA e RNA (Kim et al., 1998).

A expressão do CYP1A é regulada pelo receptor aril de hidrocarbonetos (Ahr) (figura 1). A activação deste receptor ocorre após a ligação a um substrato (p.e: PAH, dioxinas), desencadeando uma série de reacções que levam ao aumento da expressão do gene do CYP1A (Denison & Nagy, 2003; Jørgensen et al., 2008; Wan et al., 2004).

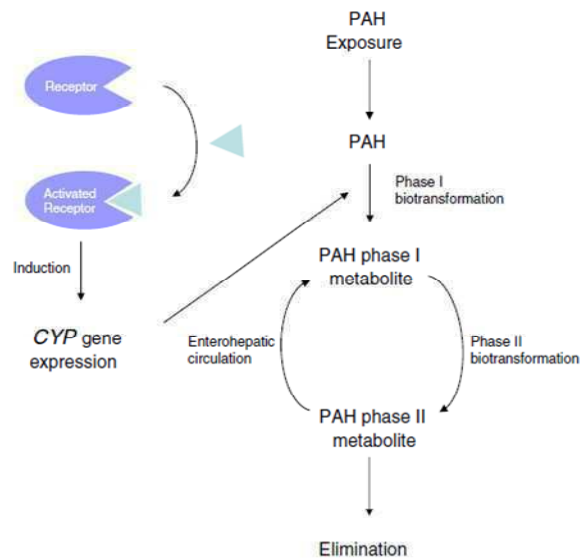


Figura 1: Mecanismo de indução do CYP por exposição a PAHs. O objecto oval representa o receptor Ahr, e o triângulo azul-claro representa a molécula de PAH. Retirado de Jorgensen et al., 2008.

Um dos biomarcadores mais aplicados em monitorização ambiental para avaliação da fase I de biotransformação é a actividade da enzima etoxiresorufinao-deetilase (EROD). Este biomarcador tem sido usado em trabalhos de exposição controlada a poluentes, observando-se indução da actividade no fígado após exposição a BaP em tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) (Costa et al., 2011) ou em douradas (*Sparus aurata*) expostas a misturas de PAHs (Kopecka-Pilarczyk & Correia, 2009). Em trabalhos de campo, verificou-se a indução desta enzima em tainhas (*Mugil chephalus*) (Ferreira et al., 2006) e em robalo (*Dicentrarchus labrax*) (Gravato & Santos, 2003; Ferreira et al., 2010) expostos a PAHs presentes na água. A funcionalidade da EROD em culturas primárias de células de peixes tem sido aplicada como forma de avaliar o potencial tóxico de poluentes *in vitro*. Vários trabalhos com culturas primárias de hepatócitos de demonstraram a indução da actividade enzimática da EROD após a exposição a compostos como PAHs (Wan et al., 2004; Naicker et al., 2007), naftalenos policlorados (PCNs)

(Pesonen et al., 2000), PCBs e a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Smeets et al., 2002).

1.1.2- Fase II de biotransformação

Na fase II de biotransformação ocorrem reacções de conjugação de moléculas endógenas com o poluente e/ou os seus metabolitos. Uma das enzimas desta fase é a glutathione-s-transferase (GST), que efectua a conjugação de glutathione aos substratos, aumentando a polaridade e permitindo a excreção dos metabolitos conjugados (Ferreira et al., 2006; Jancova et al., 2010; van der Oost et al., 2003). Em mamíferos já foram identificadas oito famílias de GSTs: *alpha*, *mu*, *pi*, *sigma*, *theta*, *omega*, *kappa*, e *zeta* (Hayes & Pulford, 1995), encontrando-se semelhanças estruturais e catalíticas de GSTs hepáticas de algumas espécies de peixes com GST-*alpha*, *mu* e *pi* de roedores (George, 1994; Doi et al., 2004; Donham et al., 2005a; Donham et al., 2005b; Trute et al., 2007). Em robalo, duas GSTs foram purificadas e tendo em conta as características apresentadas foram relacionadas com as GSTs *theta* e *alfa* de mamíferos (Angelucci et al., 2000). Em peixes, o mecanismo de regulação da expressão dos genes que codificam para as GSTs supõe-se que poderá ocorrer através da cascata de sinalização associada ao Ahr, de modo similar ao observado na regulação da expressão do CYP (Blanchette et al., 2007).

A actividade da GST tem sido usada como biomarcador de fase II de biotransformação após exposição a poluentes como PAHs, PCBs, dibenzodioxinas policloradas (PCDD) e pesticidas organoclorados (OCP) (van der Oost et al., 2003). No entanto, vários trabalhos relatam diferentes respostas à exposição a poluentes. Após exposição de tilápia do Nilo ao BaP, pela água e pela dieta, a actividade da GST hepática manteve-se inalterada (Costa et al., 2011). O mesmo

resultado foi relatado em robalo no trabalho de Reis-Henriques et al (2009), após injeção intraperitoneal de fenantreno. Contudo, outro estudo demonstrou a indução da GST após exposição ao BaP em robalo (Gravato & Guilhermino, 2009). A actividade da GST tem sido também avaliada em modelos *in vitro*, verificando-se indução da actividade em culturas primárias após exposição a PAHs (Sanbacka & Isomaa, 2000) e a compostos halogenados (Neto et al., 2007).

1.1.3– Fase 0/III da destoxificação

As fases 0 e III são mediadas por proteínas transmembranares pertencentes à superfamília ABC (*ATP-binding cassette*). Estas estão envolvidas no mecanismo de *Multidrug Resistance* (MDR), caracterizado pelo efluxo activo de um largo espectro de químicos citotóxicos, tornando as células resistentes à sua actuação (Zucchi et al., 2010). Este mecanismo foi inicialmente descrito em células tumorais de mamíferos (Danø, 1973), e em espécies aquáticas foi descrito um mecanismo análogo denominado por *Multixenobiotic Resistance* (MXR) (Kurelec, 1992).

Os transportadores ABC efectuam o efluxo de diversos substratos necessitando da energia obtida da ligação e hidrólise de moléculas de ATP (Locher, 2009; Rees et al., 2009). No Homem estão identificadas 49 subfamílias, organizadas de ABCA a ABCG (Dean et al., 2001), e 77% destas possuem homologia em peixe-zebra (*Danio rerio*) (Anillo et al., 2006), tendo sido recentemente identificada mais uma subfamília (ABCH) nesta espécie (Popović et al., 2010), ainda sem função conhecida. Como características gerais estas proteínas possuem dois domínios de ligação de nucleótidos (nucleotide binding domain – NBD) e dois domínios transmembranares (transmembrane domain – TMD) (Moody & Thomas, 2005; Davidson et al., 2008), embora algumas subfamílias possuam diferenças em

relação a este modelo. Das diversas subfamílias dos transportadores ABC, as que têm captado maior interesse em toxicologia, por ter sido comprovado o seu envolvimento no transporte de xenobióticos, são a P-glicoproteína (Pgp – ABCB1) pertencente à subfamília ABCB, as *Multidrug Resistance-associated Protein*'s (MRPs) pertencentes à subfamília ABCC, e a *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP – ABCG2) da subfamília ABCG (Epel et al., 2008; Leslie et al., 2005).

A Pgp (figura 2) foi o primeiro transportador ao qual se associou o mecanismo MDR (Danø, 1973; Juliano & Ling, 1976) e MXR (Kurelec, 1992), possuindo peso molecular próximo de 170 kDa e composta por dois domínios NBD e TMD (Aller et al., 2009). Nos peixes a sua presença foi detectada na generalidade dos órgãos, sendo mais expressa em tecidos barreira como intestino, fígado, brânquia e rim (Bard, 2000; Hemmer et al., 1995; Kleinow et al., 2000). Os substratos que transloca, embora sem especificidade a um único tipo, são maioritariamente hidrofóbicos, de carga neutra ou positiva, e de tamanho reduzido, podendo ser de origem endógena ou exógena (Epel, 2008; Zaja et al., 2011). Este transportador tem sido considerado como uma primeira linha de defesa, por efectuar maioritariamente o efluxo de compostos não metabolizados (figura 3) (Bard, 2000).

As MRPs (figura 2) são proteínas pertencentes à subfamília ABCC. As MRP1–3, MRP6 e MRP7 são compostas por dois domínios NBD e três domínios TMD, ao passo que as MRP4–5 possuem dois domínios NBD e dois TMD (Leslie et al., 2005). A expressão génica deste tipo de transportadores em peixes foi detectada em diversos tecidos, como rim, intestino e fígado (Cai et al., 2003; Loncar et al., 2010). Efectuam o efluxo de metabolitos resultantes dos processos das fases I e II de biotransformação, embora se liguem maioritariamente a moléculas

provenientes desta última fase conjugadas com glutaciona, ácido glucorónico ou sulfato (Keppler et al., 1998; Zaja et al., 2008), sendo por isso consideradas como intervenientes na chamada de fase III da destoxificação (figura 3) (Bard, 2000).

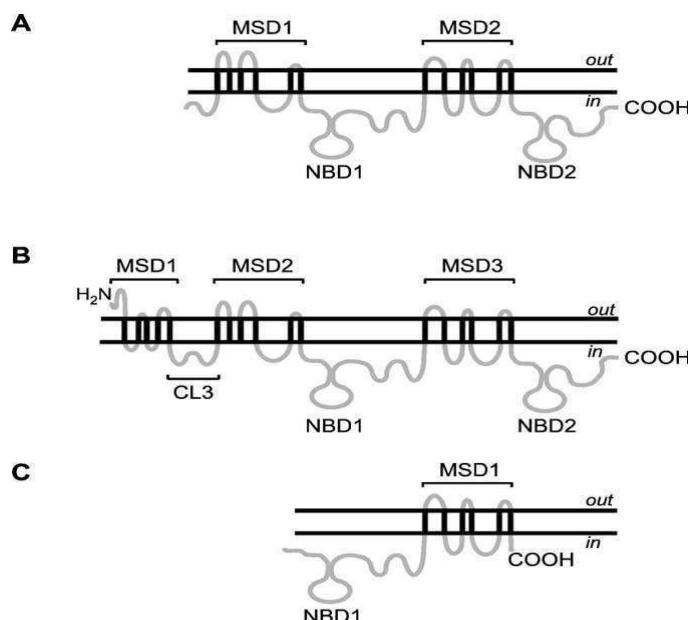


Figura 2: Esquema de transportadores membranares. A) Representação esquemática da estrutura da Pgp e das MRP4-5 com dois domínios NBD e dois domínios Membrane Spanning Domain (MSD), mencionado no texto como domínio TMD. B) Estrutura das proteínas MRP1-3, MRP6 e MRP7. C) Estrutura da BCRP. Adaptado de Leslie et al., 2005.

A BCRP (figura 2) é considerada um transportador incompleto, apresentando na sua estrutura um domínio NBD e um domínio TMD, necessitando por isso de estar ligada a um outro transportador BCRP para se tornar funcional (Epel et al., 2008). A expressão nos tecidos dos peixes é muito similar ao encontrado em mamíferos (Leslie et al., 2005), existindo trabalhos que relatam expressão elevada deste transportador no fígado, gónadas e intestino (Loncar et al., 2010). Transporta essencialmente metabolitos resultantes da fase II da destoxificação (Paetzold et al., 2009), preferencialmente conjugados com grupos sulfato (Leslie et al., 2005), logo envolvida na fase III (figura 3).

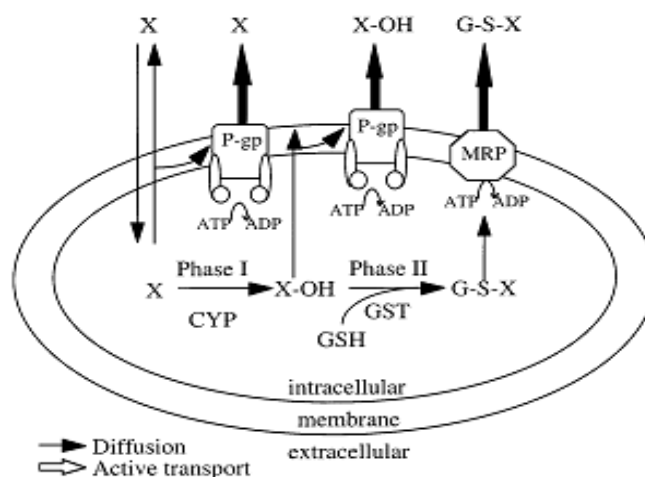


Figura 3: Integração das fases 0 (Pgp), I (CYP1A), II (GST) e III (MRP) na detoxificação. “X” representa um xenobiótico hidrofóbico. Retirado de Bard, 2000.

A cooperação entre os transportadores ABC e os mecanismos de biotransformação tem sido sugerida (figura 3) (Bard, 2000), existindo estudos que mostram um aumento da expressão destes transportadores em espécies aquáticas que habitam locais poluídos (Bard et al., 2002a; Bard et al., 2002b; Paetzold et al., 2009).

Neste panorama de protecção celular a Pgp efectua preferencialmente o efluxo de xenobióticos não transformados, correspondendo assim a uma fase 0 da detoxificação. Estudos efectuados com linhas celulares de mamíferos demonstraram que a Pgp era capaz de efluxar contaminantes ambientais como o BaP (Yeh et al., 1992), o 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (Phang et al., 1993), e pesticidas como o endossulfano (Bain & LeBlanc, 1996).

Após a intervenção dos mecanismos da fase II de biotransformação, o conjugado será efluxado via fase III da detoxificação pelas MRPs e BCRP. Peixes da espécie killifish (*Fundulus heteroclitus*) de zonas poluídas com PAHs e PCBs apresentavam aumento da expressão dos transportadores ABCC2 e ABCG2, o que

os autores relacionaram com a acumulação de metabolitos (Paetzold et al., 2009). Estudos *in vitro* evidenciaram a interacção entre os transportadores e a fase II de biotransformação, pelo efluxo de metabolitos de compostos endógenos (Jedlitschy et al., 1996, 1997) e mesmo de metabolitos conjugados do BaP (Myllynen et al., 2007), em células de cancro mamário humano.

1.2- Culturas primárias

Embora a experimentação animal seja uma prática comum nas diversas áreas da ciência, tem-se procurado medidas alternativas que permitam reduzir a utilização de animais em laboratório, pela proposta política dos 3Rs (Reduce, Replace, Refine – reduzir, substituir, refinar) (Scholz et al., 2008). Assim, foi com bastante expectativa que se obtiveram progressos com a cultura de células animais. Em ecotoxicologia os estudos de efeito de poluentes *in vitro* são feitos a par com os estudos *in vivo*. Como a actuação de um químico é inicialmente ao nível celular (Fent, 2001), supõe-se que alterações a este nível terão efeitos posteriores nos tecidos, órgãos, e finalmente no organismo (Schirmer, 2006). O recurso a culturas de células permite testar um grande número de compostos, diminuir a quantidade de químicos necessários ao ensaio e, por consequência, reduzir a quantidade de resíduos tóxicos produzidos (Schirmer, 2006).

As culturas primárias de células são obtidas a partir de tecidos e órgãos, e ao contrário das linhas celulares, cuja propagação pode nalguns casos ser infinita, possuem um tempo de vida limitado, sendo viáveis apenas por dias ou semanas (Segner, 1998). Ao contrário de muitas linhas celulares, as culturas primárias mantêm intactas as suas características bioquímicas, entre as quais os mecanismos de destoxificação (Neto et al., 2006; Smeets et al., 2002; Wan et al., 2004).

O fígado, como principal órgão metabólico, possui especial relevância nos mecanismos de destoxificação dos organismos (Segner, 1998), e para se compreender estes mecanismos têm-se utilizado culturas celulares de hepatócitos (Sturm et al., 2001; Schirmer, 2006). Trabalhos realizados com culturas primárias demonstraram indução da expressão génica e da actividade enzimática do CYP após exposição de hepatócitos de truta a β -naftoflavona (BNF), reconhecido indutor do CYP (Aluru & Vijayan, 2006), TCDD (Sadar & Anderson, 2001), e PAHs como o BaP (Naicker et al., 2006), tendo sido igualmente demonstrada a funcionalidade dos mecanismos de fase II após exposição ao TCDD (Wan et al., 2004). Estudos recentes com culturas primárias de hepatócitos de truta caracterizam a presença e funcionalidade dos transportadores ABC (Sturm et al., 2001; Zaja et al., 2008).

No entanto a grande maioria destes estudos foram efectuados com culturas primárias de hepatócitos de peixes de água doce, existindo poucos trabalhos onde foram aplicadas culturas primárias de hepatócitos de espécies marinhas no contexto ecotoxicológico (Smeets et al., 2002; Tutundjian et al., 2002; Winzer et al., 2002).

1.3– Organismo modelo

Neste trabalho, o organismo modelo seleccionado foi o robalo (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeu 1758). Este peixe possui uma ampla distribuição na costa europeia e norte de África, e tem sido usado como modelo na avaliação das vias de biotransformação *in vivo* após exposição a PAHs, verificando-se indução da EROD quer após exposição ambiental a PAHs (Ferreira et al., 2010; Fonseca et al., 2011), quer em laboratório (Gravato & Santos, 2003). Ao contrário da EROD, a actividade da GST não possui um padrão de resposta tão evidente, existindo

trabalhos onde não ocorreu indução da actividade da enzima, quer em animais expostos a misturas de PAHs no meio (Ferreira et al., 2010; Fonseca et al., 2011), quer após exposição controlada a PAHs individuais, como reportado em Reis-Henriques et al. (2009) após administração intraperitoneal de fenantreno a robalos.

O facto de os seus mecanismos de biotransformação estarem descritos e serem aplicados em diversos estudos em toxicologia, associado à facilidade na sua obtenção e manutenção, foram factores que contribuíram para a escolha do robalo como organismo modelo neste trabalho.

1.4- Objectivos

Os objectivos deste trabalho são, avaliar a funcionalidade dos processos de destoxificação em culturas primárias de hepatócitos de robalo, após exposição a um PAH, o BaP, medindo:

- A expressão do mRNA de genes que codificam para proteínas envolvidas nas fases de destoxificação, nomeadamente transportadores ABC e CYP1A;
- A capacidade catalítica das fases I e II de biotransformação em culturas primárias de hepatócitos, e;
- A funcionalidade dos transportadores ABC e efeito do BaP na actividade dos transportadores.

2. Materiais e métodos

2.1 – Manutenção dos robalos

Os robalos (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeu 1758) foram adquiridos a uma aquacultura no norte de Portugal, Póvoa de Varzim, e mantidos em tanques com capacidade para 3000 L de água salgada ($32,2 \pm 1,0$), temperatura de 18 ± 1 °C, arejamento constante (de forma a manter os níveis de oxigénio próximos de 100 %), filtro biológico e fotoperíodo natural. Os níveis de amónia e nitratos foram regularmente monitorizados e mantidos abaixo de 0,5 mg/mL.

2.2 – Isolamento de hepatócitos

Os animais foram sacrificados por contusão craniana, e na zona abdominal, após limpeza com etanol a 70 %, efectuou-se a incisão. A veia porta foi cânulada (cânula de 24 G) e efectuou-se a perfusão do fígado em dois passos: 1) 10 min com solução A (176 mM NaCl; 4,82 mM KCl; 0,44 mM KH_2PO_4 ; 3,6 mM NaHCO_3 ; 0,35 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 10 mM HEPES; 5 mM Na_2EDTA ; pH 7,6), fluxo de 10 min/mL, com o objectivo de remover células sanguíneas; e, 2) 6 min com solução B (solução A sem Na_2EDTA , com colagenase IV a 0,01 mg/mL e CaCl_2 a 2,5 mM), previamente aquecida a 37 °C, fluxo 10 mL/min, para degradação das ligações intercelulares. Após a perfusão, o fígado foi cuidadosamente removido da cavidade abdominal e colocado numa placa de petri em gelo, onde se efectuou a disrupção mecânica. A suspensão celular foi filtrada através de uma malha de 200 μm para solução C (solução B sem colagenase IV, e com 1 % albumina bovina sérica – BSA), e filtrada novamente com uma malha de 64 μm . A suspensão celular foi lavada e centrifugada três vezes em Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) a 100 g, 5 min, a 4 °C. Os hepatócitos foram transferidos para solução

HBSS com 5 % soro fetal bovino (FBS) e o número de células contado recorrendo a uma câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripano, sendo os hepatócitos colocados em cultura, para uso nos ensaios posteriores, apenas no caso de se obter uma viabilidade celular superior a 90 %. Os hepatócitos (50×10^4 por poço) foram incubados em placas de 24 poços, durante a noite, a 16 ± 1 °C em 400 μ L de HBSS+5 % FBS, 10 U/mL de penicilina, 10 μ g/mL de estreptomicina, e 0,025 μ g/mL de anfotericina. Os poços da placa foram previamente revestidos com Matrigel (0,1mg/L em HBSS) de acordo com as recomendações do fabricante (BD Bioscience).

2.3–Exposição ao Benzo(a)Pireno

Após sedimentação (16–18 h), os hepatócitos foram expostos a benzo(a)pireno (BaP) em diferentes concentrações. Da cultura de hepatócitos foram retirados 150 μ L de meio dos poços, e adicionaram-se 250 μ L de BaP. Os hepatócitos foram expostos, em triplicado, a 10^{-15} , 10^{-12} , 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M de BaP, preparado em HBSS, para utilização em ensaios enzimáticos, enquanto que para a avaliação da expressão génica foram expostos às concentrações de 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-7} e 10^{-6} M de BaP, quatro réplicas por concentração. Foram usados dois controlos, um de meio HBSS e outro de solvente, com acetona diluída em HBSS, em concentração final nunca superior a 0,2 %. Os hepatócitos foram incubados na presença de BaP durante 24 h, a 16 ± 1 °C. Após a incubação observou-se a morfologia das células em microscópio óptico invertido (Leica).

2.4– Extracção de RNA e síntese de cDNA

Após exposição ao BaP, o meio de cultura foi removido e os hepatócitos lavados com 400 μ L de tampão fosfato salino (PBS) estéril. O RNA total dos hepatócitos

foi isolado recorrendo ao kit *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare©). Este kit permite a extracção rápida e eficiente do RNA das amostras através de coluna, e a contaminação com DNA foi eliminada recorrendo a um tratamento na coluna com DNase. A qualidade do RNA obtido foi confirmada através da observação das bandas de rRNA em gel de agarose (1 % agarose em tampão Tris-Acetato-EDTA -TAE; condições de electroforese: 120 V, 400 mA, 20 min) com luz ultra-violeta, usando *GelRed* como corante. A quantidade do RNA isolado foi determinada recorrendo ao kit *Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kit* (Invitrogen), seguindo-se as indicações do fabricante. A fluorescência resultante da reacção do RiboGreen com o RNA foi lida a λ_{ex} 485 nm e λ_{em} 538 nm (Thermo Labsystem Fluoroskan Ascent), determinando-se a quantidade de RNA recorrendo a uma recta-padrão de rRNA (20 ng, 100 ng, 500 ng e 1 μ g).

Foram utilizados 10 ng de RNA para síntese de cDNA, recorrendo-se ao kit *iScript™cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad), seguindo-se as recomendações do fabricante. Aos 10 ng de RNA foram adicionados 4 μ L de 5x *iScript Reaction Mix*, 1 μ L de *iScript Reverse Transcriptase*, e fez-se o volume final de 20 μ L com água livre de nucleases. As condições de síntese foram: 5 min a 25 °C, 30 min a 42 °C, 5 min a 85 °C. Este kit utiliza como transcriptase reversa Rnase H⁺, e uma mistura de oligo(dt) e *primers* aleatórios. Após a síntese o cDNA foi armazenado a -20 °C até utilização futura.

2.5- Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

A expressão génica foi avaliada por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR), utilizando o fluoróforo SybrGreen. O desenho dos *primers* para quantificação da expressão dos genes ABCC1, ABCC2, CYP1A, factor de alongação-1 (EF1), subunidade ribossomal 18S, e proteína ribossomal L17 foi efectuado a partir de sequências disponíveis no GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI),

utilizando o programa Primer3 (<http://biotools.umassmed.edu>). Os números de acesso das sequências utilizadas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Número de acesso, sequência, concentração, eficiência e tamanho do fragmento para cada par de *primers* utilizados (F- *primer forward*; R- *primer reverse*), para os genes em estudo.

Gene (Número de acesso)	Sequência (5' → 3')	Concentração (nM)	Eficiência (%)	Tamanho fragmento (pb)
ABCC1 (GQ273982)	F - CATCCGAGCCTTTGGTGAAC	600	104,1	80
	R - GGTAAGCCTTCTGATTGTGG	600		
ABCC2 (GQ2739783)	F - CCTGGTTGGCTTGTCTATATCC	600	99,9	124
	R - CTCGCTGTATTCACTCACTCTC	600		
CYP1A (AJ251913.1)	F - TGTGCTTTGGCCGGCGCTAT	600	104,3	102
	R - CTGCTGGGTTGCCACTGCCC	450		
18S (AM419038.1)	F - ACGGACGAAAGCGAAAGC	300	107,6	94
	R - CGGAACACGACGGTATCTG	600		
L17 (AF139590.1)	F - TCCTGCGGTGGTGATACG	600	94,6	99
	R - CCTTTGTTGCTTACTATGACTCC	900		
EF1 (AJ866727.1)	F - GGACACAGAGACTTCATCAAGAAC	600	99,3	84
	R - ACCAACACCAGCAGCAACG	300		

Os *primers* foram encomendados à STABVIDA (STABVIDA Lda, FCT/UNL), e a identidade do fragmento, para o qual codificam, testada em PCR convencional. Na reacção de PCR foram adicionados 5 µL de 5x *Colorless GoTaq Buffer* (Promega), 2,5 µL de MgCl₂ a 25 mM (Promega), 0,5 µL de dNTPs a 10 mM (5Prime), 1 µL dos *primers forward* e *reverse* a 20 mM, 0,125 µL de *GoTaq Polymerase* a 5 U/µL (Promega) e 1 µL de cDNA, perfazendo com água ultra-pura o volume de 25 µL. As condições de PCR utilizadas foram: desnaturação a 95 °C durante 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 seg, *annealing* a 54 °C durante 30 seg, polimerização a 72 °C durante um min, e uma extensão final a 72 °C durante 10 min. Depois da visualização dos produtos em gel de agarose (1 % agarose em TAE) o fragmento de tamanho esperado, para cada par de *primers* (Tabela 1), foi extraído do gel recorrendo ao kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band*

Purification Kit (GE Healthcare). O fragmento purificado foi incluído no vector *pGem T-easy* do kit *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega), e amplificado em células *Escherichia coli* do kit *Novablue Single Cells I* (Novagen), tendo-se seguido as instruções dos fabricantes. As células foram plaqueadas em meio de cultura *Lysogeny Broth* (LB)/Ampicilina/IPTG/X-Gal e deixadas a incubar durante a noite a 37 ± 1 °C. Utilizando o método de *Blue/White Screening* seleccionaram-se as colónias brancas que possuíam o fragmento de interesse, sendo confirmada a identidade do fragmento por PCR convencional adicionando, por reacção, 2 µL de 5x *Colored Buffer* (Promega), 1 µL de MgCl₂ a 25mM (Promega), 0,2 µL dNTPs a 10mM (5Prime), 0,5 µL de *primers forward* e *reverse* a 20mM, 0,05 µL de *GoTaq Polymerase* a 5 U/µL (Promega), e 5,75 µL de água ultra-pura. As colónias que possuíam o fragmento foram repicadas e incubadas durante a noite, com agitação, a 37 ± 1 °C em meio de cultura LB/Amp líquido. O DNA do vector foi extraído recorrendo ao kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) tendo-se enviado uma amostra de DNA purificado para sequenciação (STABVIDA Lda, FCT/UNL). A identidade da sequência foi analisada recorrendo ao *software Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST - NCBI) e *BioEdit 7.0* (Hall, 1999). Na reacção de qRT-PCR foram adicionados 10 µL de SybrGreen Master Mix (BioRad), 1 µL de cDNA, 2 µL dos *primers forward* e *reverse* (tabela 1), e 5 µL de água ultra-pura. As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação a 95 °C durante 3 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 10 seg, *annealing* a 54 °C durante 30 seg, e polimerização a 72 °C durante 30 seg. No final da reacção foi efectuada uma curva de *melting* (55 °C a 95 °C) para verificar a formação de produtos específicos. A concentração de cada par de *primers* foi otimizada testando diferentes combinações das concentrações dos *primers forward* e *reverse*, e optou-se pela combinação que apresentava *Cycling Threshold* (Cts) mais baixos e níveis mais elevados de

fluorescência. A eficiência da reacção de PCR foi calculada através de uma recta-padrão de cDNA (0,05 ng/ μ L a 25 ng/ μ L). A expressão do mRNA dos genes de referência foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta Ct}$, sendo ΔCt a diferença do Ct da condição experimental (exposição a BaP ou controlo solvente) e do Ct do controlo. A expressão do mRNA que codifica para os transportadores ABCC1, ABCC2 e para o CYP1A foi calculada pelo método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001), normalizando-se com a expressão do gene de referência. Esta fórmula foi usada porque a eficiência de cada par de *primers* foi próxima dos 100% (Tabela 1).

2.6- Avaliação da actividade enzimática

A actividade da etoxiresorufina-o-deetilase (EROD) foi avaliada pelo método descrito por Behrens et al., (1998) medindo a produção de resorufina a partir do substrato 7-etoxiresorufina (7-ER). Após 24 horas de exposição ao BaP, o meio de cultura foi removido e os hepatócitos lavados duas vezes com 400 μ L de PBS frio para remover o BaP. Adicionaram-se 400 μ L de 7-ER (concentração final de 2 μ M em PBS), e incubou-se durante 30 min, 16 ± 1 °C, no escuro. A fluorescência foi medida a λ_{ex} 530 nm e λ_{em} 585 nm (Thermo Labsystem Fluoroskan Ascent) e a actividade da EROD expressa em pmol/min/mg proteína, recorrendo-se a uma recta-padrão de resorufina (1,5 nM a 1000 nM).

A glutationa-s-transferase (GST) conjuga a glutationa ao substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno), sendo a actividade da GST medida pela formação deste conjugado. Após exposição ao BaP, o meio foi removido das placas e os hepatócitos lavados duas vezes com 400 μ L PBS. Adicionaram-se 250 μ L de tampão de homogeneização (50 mM tampão fosfato de potássio; 0,1 mM Na_2EDTA ; pH 7,0) e resuspenderam-se as células mecanicamente. A suspensão foi homogeneizada com sonicador (40 W, 10-15 seg), e o homogeneizado

centrifugado a 10000 g, 15 min, a 4 °C, tendo-se armazenado o sobrenadante a -80 °C até uso posterior. A actividade da GST foi determinada de acordo com o método descrito em Ferreira et al (2008). A 100 µL da amostra foram adicionados 200 µL de mistura de reacção (tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, glutathione (GSH) 10 mM em tampão fosfato, e CDNB 60 mM em etanol, na proporção de 4,95:0,9:0,15). A absorvância foi medida a 340 nm após a adição da mistura de reacção durante 10 min em intervalos de 20 seg (Biotek PowerWave 340). A actividade foi expressa em nmol/min/mg proteína, com base no coeficiente de extinção molar do CDNB ($\epsilon_{340} = 0,0096 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry adaptado a microplacas. Às amostras, branco e padrões foram adicionados 80 µL de Solução A+B (Solução A: 2 % w/v Na_2CO_3 e 2 % w/v tartarato de sódio e potássio em 0,1 M NaOH; Solução B: uma gota de H_2SO_4 e 1% w/v CuSO_4 em água destilada), na proporção de 5:0,1, e incubou-se durante 10 min à temperatura ambiente, tendo-se de seguida adicionado 40 µL de Reagente de Folin (1:1 em água destilada), e incubado no escuro, com agitação, durante 30 min. A absorvância foi lida a 690 nm (Biotek PowerWave 340), determinando-se a quantidade de proteína através de uma recta-padrão de BSA (3,13 µg a 250 µg).

2.7- Avaliação da actividade dos transportadores ABC

A actividade dos transportadores ABC foi avaliada pela acumulação de Rodamina 123 (Rh123) no interior das células, após incubação na ausência ou presença de MK571 (inibidor de MRPs) e Ciclosporina-A (CycA, inibidor de MRPs e Pgp) nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 50 µM, em HBSS. O mesmo ensaio foi efectuado na presença de BaP, nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios enzimáticos, para avaliar o seu efeito na actividade dos transportadores ABC. Após o período de adesão dos hepatócitos ao fundo do

poço recolheram-se 150 μL de meio e adicionaram-se 125 μL dos inibidores (CycA dissolvida em etanol, MK571 dissolvido em dimetilsulfóxido - DMSO), ou de BaP, nas diferentes concentrações, em triplicado. Após um período de pré-incubação de 3 a 5 min, foram adicionados 125 μL de Rh123 (concentração final de 2 μM em HBSS), e a placa incubada durante 2 h, a 16 ± 1 °C, no escuro. Após o período de incubação as células foram lavadas duas vezes com 400 μl de PBS frio, e provocou-se a sua lise adicionando 400 μL de 0,1 % *Triton X-100*-PBS. A fluorescência da Rh123 intracelular foi medida a λ_{ex} 485 nm e λ_{em} 538 nm (Thermo Labsystem Fluoroskan Ascent), tendo-se expresso os valores de acumulação de Rh123 em percentagem em relação ao controlo.

2.8- Avaliação da viabilidade celular

Os efeitos citotóxicos dos químicos utilizados nas exposições foram avaliados pelo teste de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Após exposição das células aos inibidores dos transportadores ABC (MK571 e CycA) e ao BaP o meio foi removido e efectuaram-se duas lavagens com 400 μL de PBS. Foram adicionados 220 μL de MTT dissolvido em PBS (0,5 mg/mL), e incubaram-se durante 3-4 h até formação de cristais. O meio foi removido e dissolveram-se os cristais em 200 μL de DMSO, com agitação, durante 10 min. Adicionaram-se 25 μL de tampão *Sorensen* (0,05 M glicina; 0,05 M NaCl, pH 10,5) incubando-se durante 5 min. A absorvância foi medida a 570 nm (Biotek Powerwave 340) e a viabilidade celular expressa em percentagem em relação ao controlo.

2.9- Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro-padrão. O tratamento estatístico foi efectuado pela análise da variância a um factor (*one-way variance analysis* - ANOVA) com recurso ao teste *post-hoc* Fischer LSD para comparar diferenças entre as várias condições experimentais. Os dados foram logaritmizados para cumprir os requisitos da ANOVA. As correlações entre os vários parâmetros foram analisadas pela correlação de Pearson. Todos os testes foram efectuados recorrendo-se ao programa Statistica 7.0 (Statsoft Inc.).

2.10- Declaração de ética

Os animais usados neste trabalho foram tratados de acordo com o Decreto-Lei nº 197/96, aprovado no Parlamento Português em 1996, que estabelece as normas relativas à protecção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos.

3. Resultados

3.1 – Expressão génica

Foram testados três genes como possíveis genes de referência, factor de alongação-1 (EF1), subunidade ribossomal 18S (18S), e proteína ribossomal L17, e os níveis de expressão do mRNA nas culturas de hepatócitos estão apresentados na figura 4. Dos três genes testados só a expressão do gene L17 se manteve inalterada após exposição ao BaP. A expressão do mRNA do gene 18S foi significativamente superior ao controlo após exposição a BaP nas concentrações de 10^{-8} M e 10^{-7} M, enquanto que a expressão do gene EF1 foi significativamente superior nas concentrações de 10^{-8} M e 10^{-6} M, não podendo por isso ser aplicados como genes de referência.

Por estes motivos a expressão do gene L17 foi utilizada para a normalização da expressão do mRNA que codifica para os genes ABCC1, ABCC2 e CYP1A.

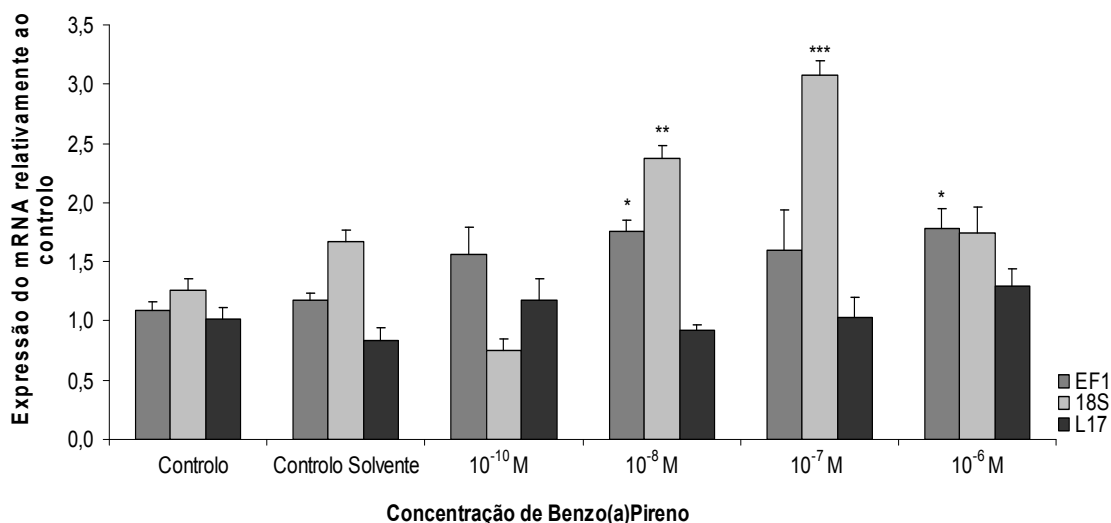


Figura 4: Expressão do mRNA dos genes de referência EF1, 18S e L17 em relação ao controlo, após exposição dos hepatócitos ao BaP. Valores apresentados como média \pm erro-padrão. N entre 3–5 isolamentos independentes.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: valores significativamente diferentes em relação ao controlo.

A expressão normalizada do mRNA dos transportadores ABCC1 e ABCC2 nos hepatócitos está representada na figura 5. Apesar de não ser significativamente diferente do controlo verificou-se um aumento da expressão do ABCC1 nas concentrações mais elevadas de BaP ($1,8 \pm 0,4$ a 10^{-7} M, e $1,8 \pm 0,3$ a 10^{-6} M de BaP). A expressão do mRNA que codifica o gene ABCC2 apresentou um aumento na concentração de 10^{-7} M de BaP ($2,0 \pm 0,2$), sendo significativo o aumento da expressão verificado na presença de 10^{-6} M de BaP ($2,3 \pm 0,7$).

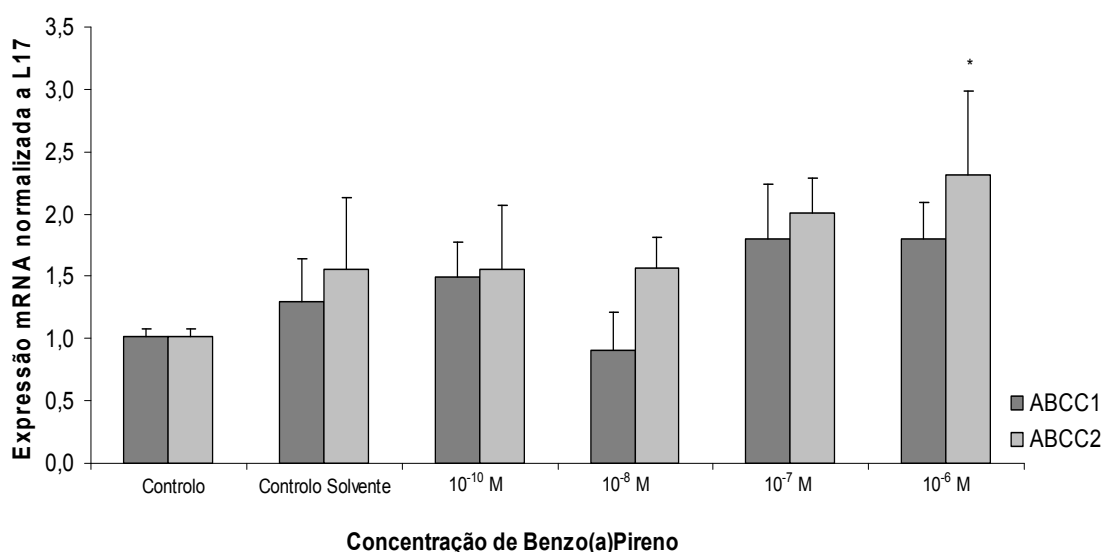


Figura 5: Expressão normalizada do mRNA dos genes dos transportadores ABCC1–2, após exposição dos hepatócitos a BaP. Valores apresentados como média \pm erro-padrão. N entre 3–5 isolamentos independentes.

* $p < 0,05$: valores significativamente diferentes em relação ao controlo.

A expressão do mRNA do gene CYP1A nos hepatócitos está representada na figura 6. A expressão foi significativamente superior ao controlo nos hepatócitos quando expostos a 10^{-7} M e a 10^{-6} M de BaP ($1,8 \pm 0,5$ e $1,7 \pm 0,7$, respectivamente). O aumento da expressão do CYP1A nos hepatócitos com o aumento da concentração de BaP, sugere um padrão dose-resposta.

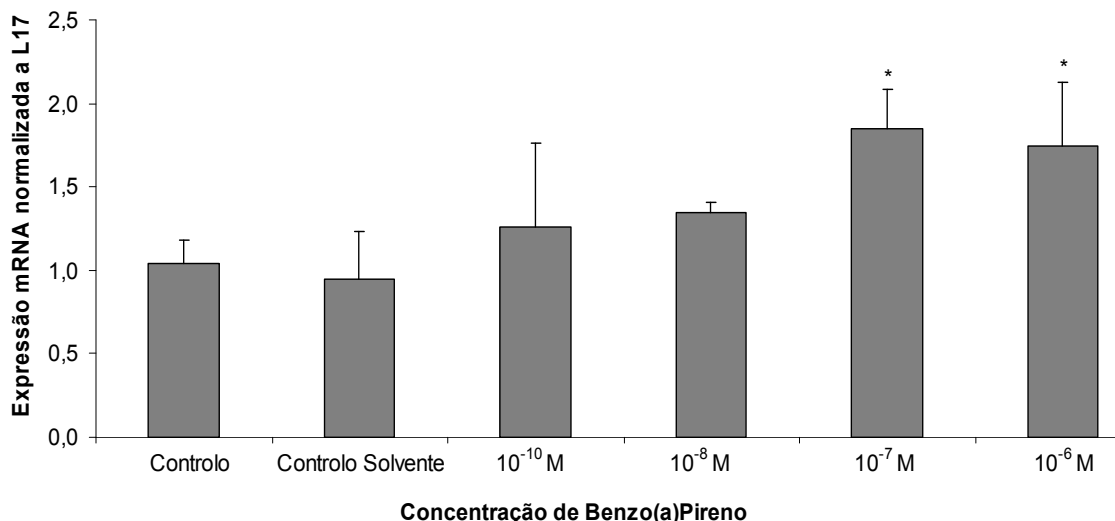


Figura 6: Expressão normalizada do mRNA do gene CYP1A, após exposição ao BaP. Valores apresentados como média \pm erro-padrão. N entre 3–5 isolamentos independentes.

* $p < 0,05$: valores significativamente diferentes em relação ao controlo.

3.2– Actividade enzimática

A actividade da EROD e da GST nos hepatócitos estão apresentadas nas figuras 7 e 8, respectivamente. A actividade basal da EROD foi de $0,8 \pm 0,2$ pmol/min/mg proteína nas culturas primárias de hepatócitos de robalo. Na presença de BaP, a actividade da EROD nos hepatócitos foi significativamente superior na concentração de 10^{-7} M (2,7 vezes) e 10^{-6} M (24 vezes) de BaP, apresentando um padrão dose-resposta.

A actividade basal da GST dos hepatócitos foi de $4,2 \pm 0,2$ nmol/min/mg proteína. Na presença de 10^{-7} M de BaP verificou-se um aumento da actividade da GST (1,3 vezes) embora sem suporte estatístico, sendo no entanto significativamente superior na presença de 10^{-6} M de BaP (1,6 vezes).

A actividade da EROD e GST apresentaram correlações significativas ($p < 0,05$) com a expressão de mRNA dos genes ABCC1 ($r=0,80$ e $r=0,73$, respectivamente) e ABCC2 ($r=0,57$, para ambas as enzimas). A actividade da EROD e GST nos

hepatócitos de robalo também se encontravam correlacionadas ($r=0,54$, $p < 0,05$), evidenciando a actuação conjunta das duas enzimas na biotransformação do BaP.

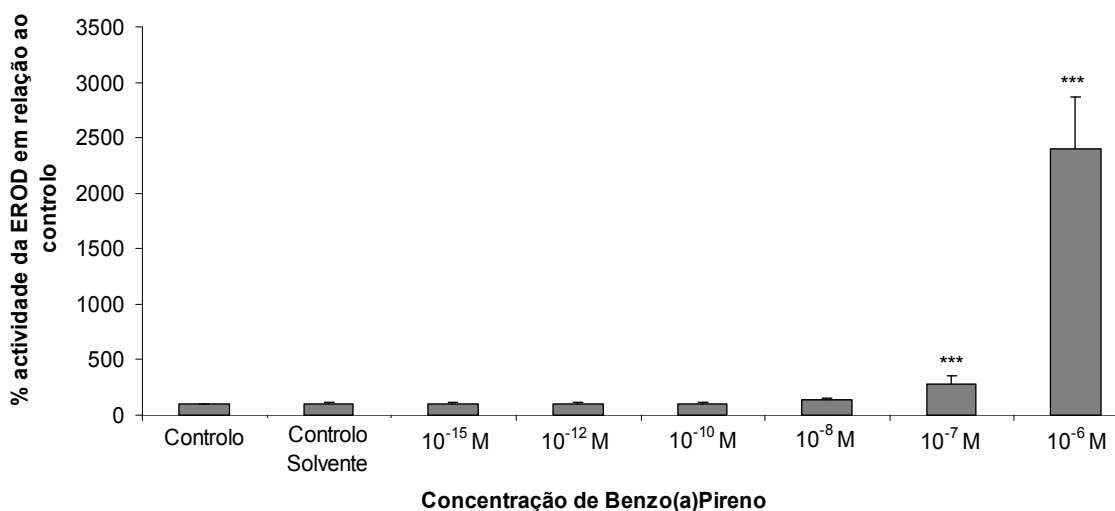


Figura 7: Actividade da EROD nos hepatócitos após exposição ao BaP. Valores são expressos em percentagem de actividade da EROD (pmol/min/mg proteína) em relação ao controlo, estabelecido como 100 %, e apresentados como média \pm erro-padrão. N entre 4-6 isolamentos independentes.

*** $p < 0,001$: valores significativamente diferentes em relação ao controlo.

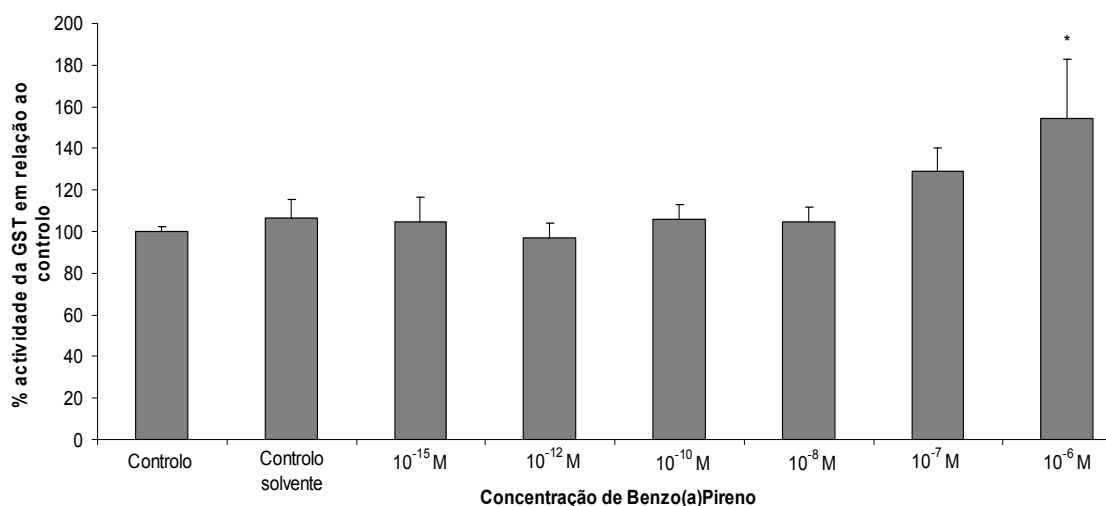


Figura 8: Actividade da GST nos hepatócitos após exposição ao BaP. Valores são expressos em percentagem de actividade da GST (nmol/min/mg proteína) em relação ao controlo, estabelecido como 100 %, e apresentados como média \pm erro-padrão. N entre 4-6 isolamentos independentes.

* $p < 0,05$: valores significativamente diferentes em relação ao controlo.

3.3- Actividade dos transportadores ABC

A actividade dos transportadores ABC foi avaliada pela acumulação intracelular do substrato Rh123 na presença ou ausência de inibidores de transportadores ABC (figura 9).

A incubação dos hepatócitos com MK571 levou a um aumento significativo da acumulação intracelular de Rh123 num padrão dose-resposta entre as concentrações de 3 μ M a 50 μ M ($13,7 \pm 0,1$ % a $138 \pm 0,2$ %, respectivamente). Após incubação com CycA a acumulação de Rh123 nos hepatócitos foi similar ao controlo em todas as concentrações testadas, com excepção da CycA a 50 μ M onde se verificou um aumento significativo de $11 \pm 0,08$ %.

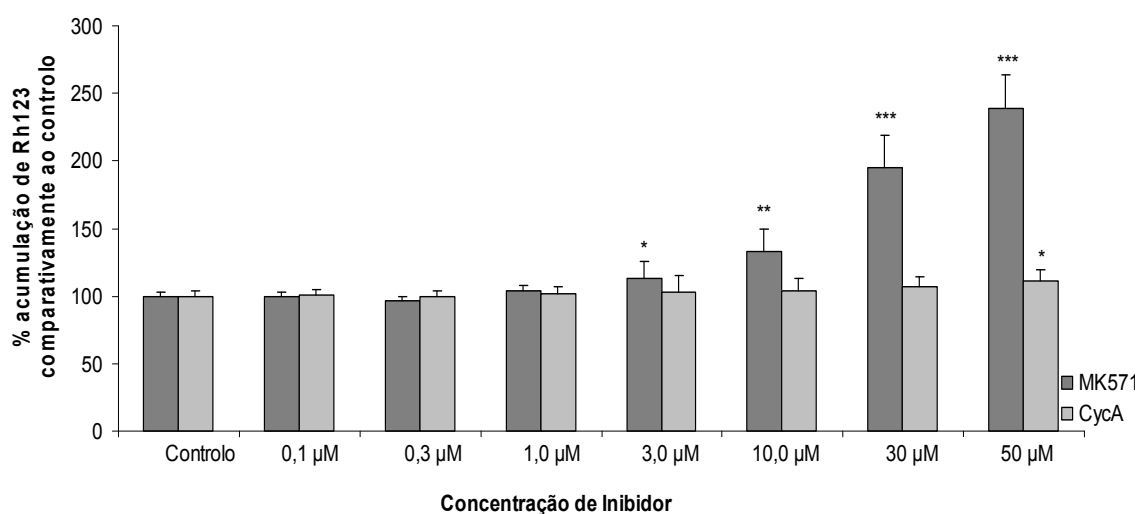


Figura 9: Acumulação de Rh123 intracelular após incubação com os inibidores MK571 e CycA. Valores apresentados como percentagem de acumulação, em média \pm erro-padrão em relação ao controlo, estabelecido como 100 %. N entre 3–5 isolamentos independentes.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: valores significativamente diferentes em relação ao controlo.

A acumulação de Rh123 no interior dos hepatócitos na presença de BaP está representada na figura 10, sendo significativamente superior ao controlo após exposição dos hepatócitos ao BaP nas concentrações de 10^{-15} M e 10^{-6} M.

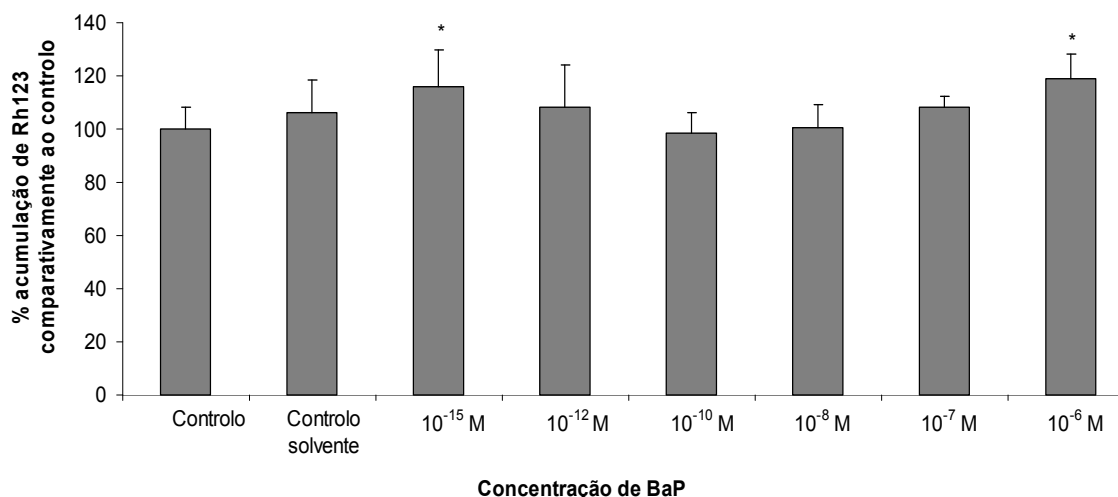


Figura 10: Acumulação de Rh123 intracelular após incubação com BaP. Valores apresentados como percentagem de acumulação, em média \pm erro-padrão em relação ao controlo, estabelecido como 100 %. N entre 3–5 isolamentos independentes.

* $p < 0,05$: valores significativamente diferentes em relação ao controlo.

3.4– Viabilidade celular

A toxicidade dos compostos utilizados nas diferentes metodologias foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT (figuras 11–12). A incubação dos hepatócitos com CycA (figura 11) e BaP (figura 12) não teve qualquer efeito ao nível da viabilidade celular, considerando-se que os compostos não foram tóxicos nas concentrações utilizadas. Curiosamente, após incubação com MK571, verificou-se um aumento da redução do MTT (figura 11), significativamente diferente nas concentrações mais elevadas do inibidor (a $30 \mu\text{M}$, $45 \pm 0,1$ %, e a $50 \mu\text{M}$ $95 \pm 0,2$ %).

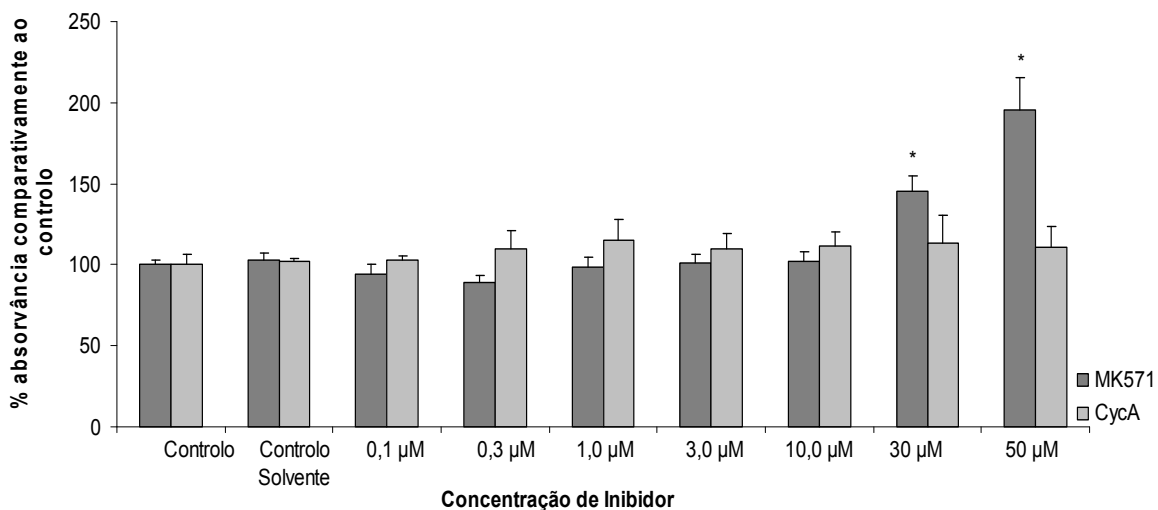


Figura 11: Viabilidade celular após incubação com os inibidores MK571 e CycA em diferentes concentrações. Valores apresentados em percentagem de absorvância média \pm erro-padrão em relação ao controlo, estabelecido como 100 %. N entre 3–5 isolamentos independentes.

* $p < 0,05$: valores significativamente diferentes em relação ao controlo.

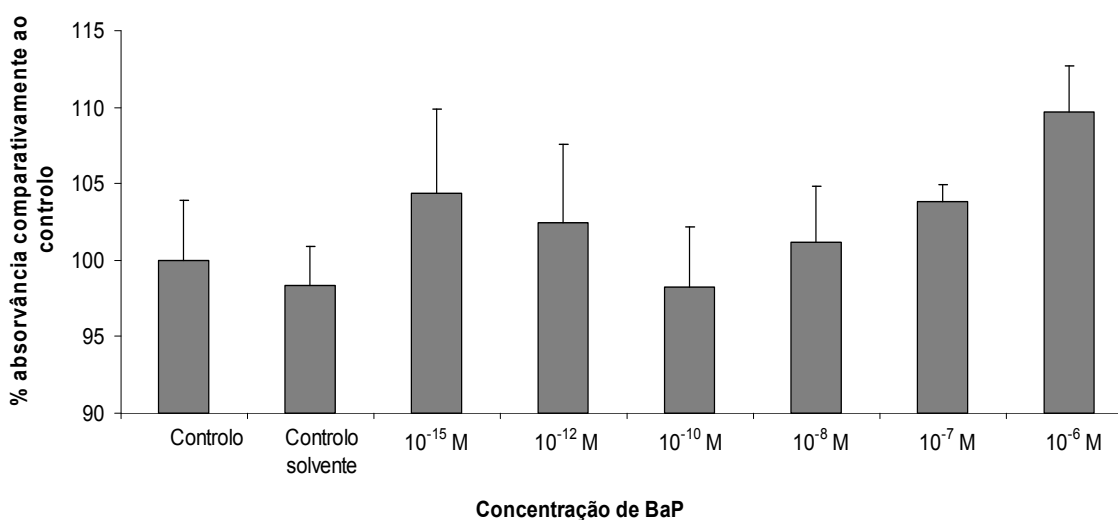


Figura 12: Viabilidade celular após incubação com BaP. Valores apresentados em percentagem de absorvância média \pm erro-padrão em relação ao controlo, estabelecido como 100 %. N entre 3–5 isolamentos independentes.

4. Discussão

Nos últimos anos a política dos 3Rs (Reduce, Replace, Refine – reduzir, substituir, refinar), tem sido cada vez mais incentivada na comunidade científica, com a finalidade de diminuir o número de animais, substituindo por estados embrionários e/ou culturas de células (Scholz et al., 2008). Os hepatócitos de peixes têm sido uma das ferramentas usadas como modelos *in vitro* em estudos de toxicologia, de forma a avaliar os efeitos de poluentes presentes no meio aquático (Naicker et al., 2007; Pesonen & Andersson, 1997; Schirmer, 2006). No entanto, poucos são os trabalhos que têm aplicado culturas primárias de hepatócitos de espécies marinhas no âmbito ecotoxicológico (Smeets et al., 2002; Tutundjian et al., 2002; Winzer et al., 2002). Assim, com o presente estudo pretendeu-se validar as culturas primárias de hepatócitos de robalo como um novo modelo *in vitro* através da análise das três fases de destoxificação, após exposição a um PAH, o BaP, quer ao nível molecular quer ao nível catalítico. Desta forma avaliou-se a fase I e II de biotransformação e os transportadores ABC, demonstrando as vantagens em usar este modelo como mais uma ferramenta *in vitro* a aplicar no estudo de efeitos de poluentes ambientais.

O recurso ao ensaio de redução do MTT permitiu averiguar a viabilidade celular dos hepatócitos após exposição aos diferentes compostos, inibidores dos transportadores ABC e BaP, tendo-se observado que não ocorreu decréscimo da viabilidade após o período de exposição. No entanto, não foi possível avaliar a toxicidade do MK571, uma vez que se observou um suposto “aumento” da viabilidade celular. Resultados semelhantes foram também obtidos por Zaja et al (2008) com culturas primárias de hepatócitos de truta após exposição ao MK571. Foi sugerido que o MTT seja um substrato dos transportadores ABC, logo na

presença do inibidor MK571 poderá ocorrer um aumento da acumulação intracelular do MTT, levando a resultados erróneos (Vellonen et al., 2004). Recentemente, o recurso a outro ensaio, o *Neutral Red*, na avaliação da viabilidade celular em substituição do MTT, permitiram confirmar que o MK571 não é um composto tóxico, nas mesmas condições de exposição, em culturas de hepatócitos primários de robalo (Ferreira, M. não publicado).

Para fazer uma análise correcta da expressão génica é essencial seguir certas directrizes, sendo uma muito importante a selecção dos genes de referência (Derveaux et al., 2010). Um bom gene de referência será, por definição, um gene que tem níveis de expressão elevados e que não apresente variação na expressão entre tecidos ou condições experimentais (Aursnes et al., 2011; Hibbler et al., 2008). Neste trabalho testaram-se três genes que têm sido aplicados como genes de referência em robalo, EF1, 18S e L17 (Mitter et al., 2009; Rocha et al., 2007; Varsamos et al., 2006). Nas condições testadas, ou seja exposição de culturas primárias de hepatócitos de robalo ao BaP, verificou-se que dos três genes avaliados, só o L17 manteve níveis de expressão inalterados. Contrariamente, na expressão dos genes 18S e EF1 observou-se um aumento significativo do mRNA após a exposição ao BaP em certas concentrações usadas. Tendo em conta estes resultados optou-se por usar a expressão do gene L17 como referência para normalizar a expressão génica dos transportadores ABC (ABCC1 e ABCC2) e CYP1A1.

Nas culturas primárias de hepatócitos de robalo, após exposição ao BaP, a expressão, ao nível da transcrição, da fase III foi avaliada pela análise da expressão de mRNA dos genes que codificam para os transportadores ABCC1 e ABCC2. Após a exposição ao BaP observou-se um aumento significativo da

expressão do gene que codifica o transportador ABCC2 na concentração mais elevada. No caso do gene que codifica o transportador ABCC1 também se verificou uma tendência para um aumento da expressão na concentração mais elevada de BaP, embora não estatisticamente significativa. Considerando que um aumento da expressão do gene se traduzirá num aumento da proteína, estes dois transportadores poderão estar de alguma forma envolvidos na destoxificação do BaP e/ou seus metabolitos. Este é o primeiro trabalho onde se avalia a expressão dos genes ABCC1 e ABCC2, que se considera estarem envolvidos no efluxo principalmente de metabolitos conjugados (Leslie et al., 2005), em culturas primárias de hepatócitos, após exposição a um PAH. No entanto, o transporte de BaP e/ou seus metabolitos por estas proteínas continua a ser um assunto controverso. Num estudo realizado com a linha celular intestinal humana, Caco-2, exposta ao BaP, foi demonstrado o aumento da expressão do mRNA da ABCB1 não se tendo observado qualquer efeito na expressão do mRNA do ABCC1 e do ABCC2 (Lampen et al., 2004). Por outro lado, no mesmo modelo *in vitro* a exposição ao BaP não teve qualquer efeito na expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCC2 (Buesen et al., 2003), o que mostra a ambiguidade nos resultados e a dificuldade em associar estes transportadores à destoxificação de determinados compostos. No entanto, em animais selvagens, capturados em locais altamente contaminados com misturas de PAHs, verificou-se um aumento significativo da expressão do mRNA do ABCC2 e da ABCG2 em fígado (Paetzold et al., 2009). Os nossos resultados vêm de encontro a estes que foram realizados com espécies aquáticas, podendo indicar que existem diferenças, ao nível da expressão dos genes dos transportadores ABC, entre células humanas e de animais marinhos. Os nossos resultados também mostraram que os transportadores ABCC1-2 são expressos nos hepatócitos de robalo em cultura, sendo um bom indicador para a sua possível aplicabilidade como um modelo para avaliar a interação de

contaminantes com estes transportadores de efluxo envolvidos na fase III do mecanismo de destoxificação. No entanto são necessário mais estudos para realmente avaliar qual o papel destes transportadores ao nível do efluxo de contaminantes ambientais e/ou seus metabolitos.

A expressão do mRNA que codifica o gene CYP1A, fase I de biotransformação, foi também avaliada nas culturas primárias de hepatócitos de robalo, tendo-se observado um aumento significativo da expressão após exposição das células nas concentrações mais elevadas de BaP. Estes resultados vêm de encontro ao que tem sido descrito por outros autores, onde se observou um aumento da expressão do mRNA do CYP1A no fígado de espécies aquáticas, após exposição a este PAH, quer em trabalhos de laboratório (Choi et al., 2008; Wang et al., 2010) quer com animais de campo expostos a PAHs (An et al., 2011; Miller et al., 1998; Paetzold et al., 2009). Da mesma forma, trabalhos realizados com linhas celulares tumorais expostas ao BaP demonstram que, *in vitro*, ocorre um aumento da expressão do mRNA que codifica o gene CYP1A, num padrão dose-resposta (Chi et al., 2009; Lampen et al., 2004). Os nossos resultados estão de acordo com o que seria esperado, tendo em conta que este composto é considerado um potente indutor da fase I de biotransformação (Fent & Bättscher, 2000), e daí a sua aplicação neste trabalho. Deste modo, foi-nos possível demonstrar a capacidade de indução, ao nível molecular, dos mecanismos de destoxificação da fase I de biotransformação, neste modelo *in vitro*.

Após o estudo molecular de duas fases integrantes do mecanismo de destoxificação, em culturas primárias de hepatócitos de robalo, avaliou-se também se a capacidade catalítica das fases de destoxificação se encontravam funcionais neste modelo.

A actividade dos transportadores ABC foi avaliada pela acumulação intracelular de um substrato específico dos transportadores, a Rh123, na presença ou ausência de inibidores dos transportadores, CycA e MK571. A presença dos inibidores levou a um aumento da acumulação intracelular da Rh123, sendo este aumento significativamente maior na presença do MK571 do que o observado na presença da CycA. Estes dados mostram a presença e funcionalidade dos transportadores ABC em culturas primárias de hepatócitos de robalo. A funcionalidade destes transportadores em hepatócitos primários de truta foi também confirmada usando a mesma metodologia, e obtendo resultados similares aos nossos (Sturm et al., 2001; Zaja et al., 2008). O mesmo método foi também aplicado em células da linha celular de hepatoma de *Poeciliopsis lucida* (PLHC-1) expostas a CycA e MK571 para avaliar a funcionalidade das proteínas de efluxo (Caminada et al., 2008). Assim, com a realização deste ensaio, foi possível concluir que nas culturas primárias de hepatócitos de robalo os transportadores ABC se mantêm funcionais. No entanto, e considerando a sobreposição do tipo de transportadores que a CycA e o MK571 inibem, não foi possível determinar qual o tipo de transportador que será predominante nos hepatócitos primários de robalo. Zaja et al. (2008), tendo em conta que os níveis de acumulação de Rh123 foram superiores na presença do MK571, levantaram a hipótese de os hepatócitos de truta apresentarem maior actividade dos transportadores MRP do que Pgp ou BCRP. No entanto, mais recentemente foi demonstrado em linhas celulares de mamíferos que o MK571 tem a capacidade de inibir todos os tipos de transportadores ABC (ABCB, ABCC e ABCG) (Matsson et al., 2009), o que invalida esta hipótese.

O papel do BaP como substrato ou inibidor dos transportadores foi igualmente avaliado pelo ensaio de MXR, tendo ocorrido um aumento significativo da acumulação intracelular de Rh123 nos hepatócitos após exposição à

concentração mais baixa e mais alta de BaP, o que não nos permitiu concluir relativamente ao efluxo do BaP e/ou seus metabolitos pelos transportadores ABC. Estudos *in vitro* referem a possibilidade do BaP ou dos seus metabolitos conjugados serem substrato, respectivamente, da Pgp na fase 0 (Yeh et al., 1992) ou das MRP e BCRP na fase III (Ebert et al., 2005; Lampen et al., 2004). Por outro lado, outros trabalhos mostram que o BaP não é transportado por transportadores como a Pgp (Schuetz et al., 1998; Zaja et al., 2011), sendo sugerido que outros transportadores o façam, mantendo-se assim a incerteza quanto ao efluxo do BaP e/ou seus metabolitos pelos transportadores ABC.

A resposta catalítica das fases I e II de biotransformação, nos hepatócitos de robalo em cultura primária, foi avaliada pela actividade das enzimas EROD e GST, respectivamente. Após exposição ao BaP, foi detectado um padrão dose-resposta da actividade da EROD, o que revela que os hepatócitos de robalo em cultura mantêm a capacidade de resposta ao nível dos mecanismos da fase I de biotransformação na presença deste composto, indutor do CYP1A. Estes resultados estão de acordo com outros estudos *in vivo* onde se observou a indução da actividade da EROD em robalo (Gravato & Santos, 2003), tilápia (Costa et al., 2011) e em killifish (Wills et al., 2010) após exposição ao BaP. Também em trabalhos aplicando células de teleósteos, se observaram níveis mais elevados de indução de actividade da EROD após 24h de exposição a 1µM de BaP (Scholz & Segner, 1999; Behrens et al., 2001; Zhou et al., 2006; Naicker et al., 2007). Para além da indução da actividade observou-se também um padrão dose-resposta na actividade da EROD o que vem também de encontro ao descrito em estudos similares com culturas primárias de hepatócitos de outras espécies aquáticas, como tilápia (Zhou et al., 2006) e peixe-gato africano (*Clarias gariepinus*) (Naicker et al., 2007), em resposta à presença do BaP. Assim, este trabalho

mostrou que as culturas primárias de hepatócitos apresentam actividade da EROD, que pode ser facilmente medida após exposição ao BaP, e possivelmente na presença de outros poluentes com as mesmas características do BaP presentes em meio aquático. Assim, o comportamento da enzima reflete o que se tem observado *in vivo* e *in vitro* o que mostra a sua possível utilização como uma nova ferramenta na avaliação dos efeitos toxicológicos à exposição a indutores do CYP1A, pelo mesmo mecanismo do BaP.

Quando avaliada a resposta catalítica da fase II de biotransformação, observou-se indução da actividade da GST após exposição dos hepatócitos apenas na concentração mais elevada de BaP. Estes dados são similares ao observado num estudo *in vivo* de exposição de robalos a BaP onde foi descrito um aumento de actividade da GST apenas nas concentrações mais elevadas (Gravato & Guilhermino, 2009). Estudos realizados *in vitro* mostraram indução da GST em culturas primárias de brânquia de truta expostas a 3-metilcolantreno (3-MC) (Sandbacka & Isomaa, 2000), e em linhas tumorais humanas Caco-2 (Buesen et al., 2003) e HepG2 (Lin & Yang, 2007) expostas ao BaP. Tendo em conta o paralelismo entre o reportado nos trabalhos *in vivo* e *in vitro*, e o observado no nosso trabalho com culturas primárias de hepatócitos de robalo, a enzima da fase II de biotransformação, a GST, mantém-se funcional e responde à presença do contaminante, não sendo no entanto a resposta detectada tão evidente como no caso da fase I de biotransformação. Apesar disso, verificou-se uma correlação significativa entre a actividade destas das duas enzimas ($r=0,54$; $p < 0,05$), o que sugere que a cooperação entre as duas fases de biotransformação também está funcional nas culturas primárias de hepatócitos de robalo. Apesar de não se ter observado correlação entre a actividade das enzimas de biotransformação e actividade dos transportadores ABC na presença do BaP, verificou-se que a actividade da EROD e GST estavam correlacionadas com a expressão génica

dos transportadores ABC, o que poderá de certa forma sugerir a existência de interacção entre as fases de biotransformação e os transportadores de efluxo. Assim, os nossos resultados podem estar a reforçar a hipótese da existência de cooperação entre as diferentes fases de destoxificação. Um facto interessante foi também a não existência de correlação entre a actividade da EROD e a expressão do mRNA do CYP1A na presença do BaP. Isto poderá estar relacionado com o tempo de vida do mRNA codificante nos hepatócitos sendo possível que o pico de indução seja anterior às 24h, não tendo por isso sido detectado no nosso trabalho. Resultados similares foram descritos por Della Torre et al (2011) em estudos *in vitro* com uma linha celular PHLC-1 exposta a fragâncias de xileno onde se verificou indução da EROD num padrão dose-resposta, enquanto que a expressão génica do CYP1A não apresentou o mesmo comportamento.

Assim, os nossos dados mostram que, nas culturas primárias de hepatócitos de robalo, as fases I e II de biotransformação assim como os transportadores ABC se mantêm funcionais, e que esta poderá ser uma nova ferramenta *in vitro* a aplicar na avaliação de efeitos de poluentes.

5. Conclusão

Este trabalho é, até à data, o único onde foram utilizadas culturas primárias de hepatócitos de robalo na avaliação de efeitos do BaP ao nível das fases de destoxificação.

Em conclusão, com os resultados obtidos aplicando as culturas primárias de hepatócitos foi possível demonstrar que:

- Ocorre resposta ao nível da expressão do mRNA dos transportadores ABCC1-2, e do CYP1A à presença do BaP, podendo ser uma indicação da cooperação nos mecanismos de destoxificação de contaminantes com capacidade indutora do CYP1A, frequentemente presentes no meio aquático;
- Os transportadores ABC se mantêm funcionais, no entanto não foi possível apurar qual o tipo de transportador que será predominante;
- As enzimas das fases de biotransformação I e II, avaliadas pela actividade da EROD e GST respectivamente, se encontram funcionais e reflectem o que seria esperado *in vivo*, na presença do BaP;

Assim, as culturas primárias de hepatócitos de robalo poderão ser consideradas como uma boa ferramenta *in vitro* em estudos de ecotoxicologia, para avaliação de efeitos de poluentes frequentemente presentes no meio marinho.

Com a finalidade de compreender melhor os mecanismos de destoxificação intervenientes na defesa dos hepatócitos após exposição a contaminantes, seria recomendável, em trabalhos futuros, avaliar a intervenção de outras enzimas do CYP1A (avaliando, por exemplo, a actividade da etoxicumarina-O-deetilase – ECOD), e actuação de outros mecanismos da fase II de biotransformação (como

as reacções de sulfatação e glucoronidação). Assim como avaliar a expressão génica de outros transportadores intervenientes no processo de destoxificação, como a Pgp e BCRP.

Tendo-se verificado que nas culturas primárias de hepatócitos de robalo os mecanismos de transcrição se encontram funcionais, assim como a actividade das proteínas, para completar todo o mecanismo dever-se-ia avaliar o processo de tradução medindo também o teor proteico. No entanto, para os transportadores ABC apenas estão disponíveis anticorpos de mamíferos o que poderá dificultar essa avaliação.

6. Referências

Aller, SG; Yu, J; Ward, A; Weng, Y; Chittaboina, S; Zhuo, R; Harrell, PM; Trinh, YT; Zhang, Q; Urbatsch, IL; Chang G. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*. **323**(5922): 1718–22.

Aluru, N; Vijayan, MM. 2006. Resveratrol affects CYP1A expression in rainbow trout hepatocytes. *Aquat Toxicol*. **77**(3): 291–7.

Angelucci, S; Sacchetta, P; Moio, P; Melino, S; Petruzzelli, R; Gervasi, P; Di Ilio, C. 2000. Purification and characterization of glutathione transferases from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Arch Biochem Biophys*. **373**(2): 435–41.

An, L; Hu, J; Yang, M; Zheng, B; Wei, A; Shang, J; Zhao, X. 2011. CYP1A mRNA expression in redeye mullets (*Liza haematocheila*) from Bohai Bay, China. *Mar Pollut Bull*. **62**(4): 718–25.

Antunes, P; Gil, O. 2004. PCB and DDT contamination in cultivated and wild sea bass from Ria de Aveiro, Portugal. *Chemosphere*. **54**(10): 1503–7.

Aursnes, IA; Rishovd, AL; Karlsen, HE; Gjøen, T. 2011. Validation of reference genes for quantitative RT-qPCR studies of gene expression in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) during temperature stress. *BMC Res Notes*. **4**:104.

Bain, LJ; LeBlanc, GA. 1996. Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein. *Toxicol Appl Pharmacol*. **141**(1): 288–98.

Bard, SM. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat Toxicol*. **48**(4): 357–389.

Bard, SM; Bello, SM; Hahn, ME; Stegeman, JJ. 2002a. Expression of P-glycoprotein in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics. *Aquat Toxicol*. **59**(3–4): 237–51.

Bard, SM; Woodin, BR; Stegeman, JJ. 2002b. Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpurascens*) exposed to environmental contaminants. *Aquat Toxicol*. **60**(1–2): 17–32.

Bebianno, MJ; Barreira, LA. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations and biomarker responses in the clam *Ruditapes decussatus* transplanted in the Ria Formosa lagoon. *Ecotoxicol Environ Saf.* **72**(7): 1849–60.

Behrens, A; Schirmer, K; Bols, NC; Segner, H. 1998. Microassay for rapid measurement of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in intact fish hepatocytes. *Mar Environ Res.* **46**(1–5): 369–373.

Blanchette, B; Feng, X; Singh, BR. 2007. Marine glutathione S-transferases. *Mar Biotechnol.* **9**(5): 513–42.

Buesen, R; Mock, M; Nau, H; Seidel, A; Jacob, J; Lampen, A. 2003. Human intestinal Caco-2 cells display active transport of benzo[a]pyrene metabolites. *Chem Biol Interact.* **142**(3): 201–21.

Buhler, DR; Williams, DE. 1989. Enzymes involved in metabolism of PAH by fish and other aquatic animals: oxidative enzymes (or phase I enzymes). In: Varanasi, U. (Ed), *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Boca Raton, 151–184.

Buhler, DR; Wang-Buhler, JL. 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* **121**(1–3): 107–37.

Cai, SY; Soroka, CJ; Ballatori, N; Boyer, JL. 2003. Molecular characterization of a multidrug resistance-associated protein, Mrp2, from the little skate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **284**(1): R125–30.

Caminada, D; Zaja, R; Smital, T; Fent, K. 2008. Human pharmaceuticals modulate P-gp1 (ABCB1) transport activity in the fish cell line PLHC-1. *Aquat Toxicol.* **90**(3): 214–22.

Chi, AC; Appleton, K; Henriod, JB; Krayner, JW; Marlow, NM; Bandyopadhyay, D; Sigmon, RC; Kurtz, DT. 2009. Differential induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo[a]pyrene in oral squamous cell carcinoma cell lines and by tobacco smoking in oral mucosa. *Oral Oncol.* **45**(11):980–5.

Choi, CY; An, KW; Shin, HS; An, MI; Jo, PG. 2008. Changes of cytochrome P4501A mRNA expression and physiology responses in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, exposed to benzo[a]pyrene. *Mar Biol Res.* **4**(6): 470–476.

Costa, J; Ferreira, M; Rey-Salgueiro, L; Reis-Henriques MA. 2011. Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.04.046

Danø, K. 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta*. **323**(3): 466–83.

Davidson, AL; Dassa, E; Orelle, C; Chen, J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev*. **72**(2): 317–64.

Dean, M; Rzhetsky, A; Allikmets, R. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. **11**(7): 1156–66.

DECRETO-LEI nº 197/96. “Diário da República. Série A” 240 (96–10–16) 3619.

DECISÃO EUROPEIA Nº2455/2001/CE. “Jornal Oficial das Comunidades Europeias. Série L” 331 (2001–12–15) 1.

Della Torre, C; Monti, M; Focardi, S; Corsi, I. 2011. Time-dependent modulation of cyp1a gene transcription and EROD activity by musk xylene in PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Toxicol In Vitro*. doi:10.1016/j.tiv.2011.05.025.

Denison, MS; Nagy, SR. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **43**: 309–34

Derveaux, S; Vandesompele, J; Hellemans, J. 2010. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. **50**(4): 227–230.

Doi, AM; Pham, RT; Hughes, EM; Barber, DS; Gallagher, EP. 2004. Molecular cloning and characterization of a glutathione S-transferase from largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver that is involved in the detoxification of 4-hydroxynonenal. *Biochem Pharmacol*. **67**(11): 2129–39.

Donham, RT; Morin, D; Jewell, WT; Burns, SA; Mitchell, AE; Lamé, MW; Segall, HJ; Tjeerdema, RS. 2005a. Characterization of glutathione S-transferases in juvenile white sturgeon. *Aquat Toxicol*. **71**(3): 203–14.

Donham, RT; Morin, D; Jewell, WT; Lamé, MW; Segall, HJ; Tjeerdema, RS. 2005b. Characterization of cytosolic glutathione S-transferases in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquat Toxicol.* **73**(3): 221–9.

Ebert, B; Seidel, A; Lampen, A. 2005. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. *Carcinogenesis.* **26**(10):1754–63.

Epel, D; Luckenbach, T; Stevenson, CN; Macmanus-Spencer, LA; Hamdoun, A; Smital, T. 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. *Environ Sci Technol.* **42**(11): 3914–20.

Fent, K; Bätischer, R. 2000. Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: Demonstration of additive interactions. *Environ Toxicol Chem.* **19**(8): 2047–2058.

Fent, K. 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicol In Vitro.* **15**(4–5): 477–88.

Ferreira, M; Antunes, P; Costa, J; Amado, J; Gil, O; Pousão-Ferreira, P; Vale, C; Reis-Henriques, MA. 2008. Organochlorine bioaccumulation and biomarkers levels in culture and wild white seabream (*Diplodus sargus*). *Chemosphere.* **73**(10):1669–74.

Ferreira, M; Caetano, M; Antunes, P; Costa, J; Gil, O; Bandarra, N; Pousão-Ferreira, P; Vale, C; Reis-Henriques, MA. 2010. Assessment of contaminants and biomarkers of exposure in wild and farmed seabass. *Ecotoxicol Environ Saf.* **73**(4): 579–88.

Ferreira, M; Moradas-Ferreira, P; Reis-Henriques, MA. 2006. The effect of long-term depuration on phase I and phase II biotransformation in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to pollutants in River Douro Estuary, Portugal. *Mar Environ Res.* **61**(3):326–38.

Fonseca, VF; França S, Serafim A, Company R, Lopes B, Bebianno MJ, Cabral HN. 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat Toxicol.* **102**(3–4): 216–27.

George, SG. 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic conjugating enzymes in fish. In: Malins, DC; Ostrander, GK. (Eds.), Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives. Lewis Publishers, CRC press. 37–85.

Goksøyr, A; Förlin, L. 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* **22**(4): 287–312.

Gravato, C; Guilhermino, L. 2009. Effects of Benzo(a)pyrene on Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.): Biomarkers, Growth and Behavior. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal.* **15**: 121–137.

Gravato, C; Santos, MA. 2003. *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotoxicol Environ Saf.* **55**(3): 300–6.

Hall, TA. 1999. BioEdit: a user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95–98.

Hayes, JD; Pulford, DJ. 1995. The glutathione S–transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **30**(6): 445–600.

Hemmer, MJ; Courtney, LA; Ortego, LS. 1995. Immunohistochemical detection of P–glycoprotein in teleost tissues using mammalian polyclonal and monoclonal antibodies. *J. Exp. Zool.* **272**(1): 69–77.

Hibbeler, S; Scharsack, JP; Becker, S. 2008. Housekeeping genes for quantitative expression studies in the three–spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *BMC Mol. Biol.* 9–18.

Jancova, P; Anzenbacher, P; Anzenbacherova, E. 2010. Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* **154**(2): 103–16.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D. 1996. Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene–encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* **56**(5): 988–94.

Jedlitschky, G; Leier, I; Buchholz, U; Hummel–Eisenbeiss, J; Burchell, B; Keppler, D. 1997. ATP–dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem J.* **327**(Pt 1): 305–10.

Juliano, RL; Ling, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **455**(1): 152–162.

Jørgensen, A; Giessing, AM; Rasmussen, LJ; Andersen, O. 2008. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine polychaetes. *Mar Environ Res.* **65**(2): 171–86.

Keppler, D; Leier, I; Jedlitschky, G; König, J. 1998. ATP–dependent transport of glutathione S–conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact.* **111–112**:153–61.

Kleinow, KM; Doi, AM; Smith, AA. 2000. Distribution and inducibility of P–glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C–219 monoclonal. *Mar Environ Res.* **50**(1–5): 313–7.

Kim, JH; Stansbury, KH; Walker, NJ; Trush, MA; Strickland, PT; Sutter, TR. 1998. Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene–7,8–diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis.* **19**(10): 1847–53.

Kopecka–Pilarczyk, J; Correia, AD. 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicol Environ Saf.* **72**(4): 1296–302

Kurelec, B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol.* **22**(1): 23–43

Lampen, A; Ebert, B; Stumkat, L; Jacob, J; Seidel, A. 2004. Induction of gene expression of xenobiotic metabolism enzymes and ABC–transport proteins by PAH and a reconstituted PAH mixture in human Caco–2 cells. *Biochim Biophys Acta.* **1681**(1): 38–46.

Latimer, JS; Zheng, J. 2003. The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment. In: Peter, E.T.D. (Ed.), PAHs: An Ecotoxicological Perspective, 7–33.

Leslie, EM; Deeley, RG; Cole, SP. 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* **204**(3): 216–37.

Lin, T; Yang, MS. 2007. Benzo[a]pyrene-induced elevation of GSH level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG2 cells. *Toxicology.* **235**(1–2):1–10.

Livak, KJ; Schmittgen, TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **25**(4):402–8.

Liu, C; Yu, K; Shi, X; Wang, J; Lam, PK; Wu, RS; Zhou, B. 2007. Induction of oxidative stress and apoptosis by PFOS and PFOA in primary cultured hepatocytes of freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquat Toxicol.* **82**(2): 135–43.

Locher, KP. 2009. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **364**(1514): 239–45.

Loncar, J; Popović, M; Zaja, R; Smital, T. 2010. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **151**(2): 209–15.

Matsson, P; Pedersen, JM; Norinder, U; Bergström, CA; Artursson, P. 2009. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res.* **26**(8):1816–31.

Meador, JP; Stein, JE; Reichert, WL; Varanasi, U. 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Rev Environ Contam Toxicol.* **143**: 79–165.

Miller, HC; Mills, GN; Bembo, DG; Macdonald, JA; Evans, CW. 1998. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchii* as an indicator of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. *Aquatic Toxicol.* **44**(3): 183–193.

Mitter, K; Kotoulas, G; Magoulas, A; Mulero, V; Sepulcre, P; Figueras, A; Novoa, B; Sarropoulou, E. 2009. Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **153**(4): 340–7.

Moody, JE; Thomas, PJ. 2005. Nucleotide binding domain interactions during the mechanochemical reaction cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Bioenerg Biomembr.* **37**(6): 475–9.

Myllynen, P; Kurttila, T; Vaskivuo, L; Vähäkangas, K. 2007. DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MCF-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833. *Toxicol Lett.* **169**(1): 3–12.

Naicker, D; Myburgh, JG; Botha, CJ. 2007. Establishment and validation of primary hepatocytes of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). *Chemosphere.* **68**(1): 69–77.

Neto, FF; Zanata, SM; Randi, MAF; Pelletier, É; Oliveira Ribeiro, CA. 2006. Hepatocytes primary culture from the Neotropical fish, trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch). *Journal of Fish Biology.* **69**(5): 1524–1532.

Neto, FF; Zanata, SM; Silva de Assis, HC; Bussolaro, D; Ferraro, MV; Randi, MA; Alves Costa, JR; Cestari, MM; Roche, H; Oliveira Ribeiro, CA. 2007. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicol In Vitro.* **21**(4): 706–15.

Nunes, M ; Marchand, P ; Vernisseau, A ; Le Bizec, B ; Ramos, F ; Pardal, MA. 2011. PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in sediment and biota from the Mondego estuary (Portugal). *Chemosphere.* **83**(10): 1345–52.

Paetzold, SC; Ross, NW; Richards, RC; Jones, M; Hellou, J; Bard, SM. 2009. Up-regulation of hepatic ABCC2, ABCG2, CYP1A1 and GST in multixenobiotic-resistant killifish (*Fundulus heteroclitus*) from the Sydney Tar Ponds, Nova Scotia, Canada. *Mar Environ Res.* **68**(1): 37–47.

Pazos, M; Rosales, E; Alcántara, T; Gómez, J; Sanromán, MA. 2010. Decontamination of soils containing PAHs by electroremediation: a review. *J Hazard Mater.* **177**(1–3): 1–11.

Pesonen, M; Andersson, TB. 1997. Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. *Aquatic Toxicol.* **37**(2–3): 253–267.

Pesonen, M; Teivainen, P; Lundström, J; Jakobsson, E; Norrgren, L. 2000. Biochemical responses of fish sac fry and a primary cell culture of fish

hepatocytes exposed to polychlorinated naphthalenes. *Arch Environ Contam Toxicol.* **38**(1): 52–8.

Phang, JM; Poore, CM; Lopaczynska, J; Yeh, GC. 1993. Flavonol-stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in multidrug-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* **53**(24): 5977–81.

Popović, M; Zaja, R; Loncar, J; Smital, T. 2010. A novel ABC transporter: the first insight into zebrafish (*Danio rerio*) ABCB1. *Mar Environ Res.* **69** Suppl: S11–13.

Reis-Henriques, MA; Ferreira, M; Coimbra, AM; D’Silva, C; Costa, J; Shailaja, MS. 2009. Phenanthrene and nitrite effects on juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*, using hepatic biotransformation enzymes, biliary fluorescence, and micronuclei as biomarkers. *Cienc. Mar.* **35**(1): 29–40.

Rees, DC; Johnson, E; Lewinson, O. 2009. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**(3): 218–27.

Rocha, A; Gómez, A; Zanuy, S; Cerdá-Reverter, JM; Carrillo, M. 2007. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. *Mol Cell Endocrinol.* **272**(1–2): 63–76.

Sadar, M.D., Andersson, T.B., 2001. Regulation of cytochrome P450 in a primary culture of rainbow trout hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **37**(3): 180–184

Sandbacka, M; Isomaa, B. 2000. Glutathione S-transferase and UDP-glucuronyltransferase activity in primary cultures of rainbow trout gill epithelial cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **127**(3): 307–15.

Schirmer, K. 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology.* **224**(3): 163–83.

Scholz, S; Fischer, S; Gündel, U; Küster, E; Luckenbach, T; Voelker, D. 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res Int.* **15**(5): 394–404.

Scholz, S; Segner, H. 1999. Induction of CYP1A in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells: concentration-response relationships of four model substances. *Ecotoxicol Environ Saf.* **43**(3): 252–60.

Schuetz, EG; Yasuda, K; Arimori, K; Schuetz, JD. 1998. Human MDR1 and mouse *mdr1a* P-glycoprotein alter the cellular retention and disposition of erythromycin, but not of retinoic acid or benzo(a)pyrene. *Arch Biochem Biophys.* **350**(2):340–7.

Segner, H. 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* **120**(1): 71–81.

Smeets, JM; Wamsteker, J; Roth, B; Everaarts, J; van den Berg, M. 2002. Cytochrome P4501A induction and testosterone hydroxylation in cultured hepatocytes of four fish species. *Chemosphere.* **46**(2): 163–72.

Sturm, A; Ziemann, C; Hirsch-Ernst, KI; Segner, H. 2001. Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured hepatocytes from *Oncorhynchus mykiss*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **281**(4): R1119–26.

Trute, M; Gallis, B; Doneanu, C; Shaffer, S; Goodlett, D; Gallagher, E. 2007. Characterization of hepatic glutathione S-transferases in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquat Toxicol.* **81**(2):126–36.

Tsukatani, H; Tanaka, Y; Sera, N; Shimizu, N; Kitamori, S; Inoue, N. 2003. Validity of mutagenic activity as an indicator of river water pollution. *Environ Health Prev Med.* **8**(4): 133–8.

Tutundjian, R; Minier, C; Le Foll, F; Leboulenger, F. 2002. Rhodamine exclusion activity in primary cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) hepatocytes. *Mar Environ Res.* **54**(3–5): 443–7.

van der Oost, R; Beyer, J; Vermeulen, NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* **13**(2): 57–149.

Varsamos, S; Xuereb, B; Commes, T; Flik, G; Spanings-Pierrot, C. 2006. Pituitary hormone mRNA expression in European sea bass *Dicentrarchus labrax* in seawater and following acclimation to fresh water. *J Endocrinol.* **191**(2):473–80.

Vellonen, KS; Honkakoski, P; Urtti, A. 2004. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur J Pharm Sci.* **23**(2): 181–188.

Wan, X; Ma, T; Wu, W; Wang, Z. 2004. EROD activities in a primary culture of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) hepatocytes exposed to polychlorinated aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicol Environ Saf.* **58**(1): 84–9.

Wang, L; Camus, AC; Dong, W; Thornton, C; Willett, KL. 2010. Expression of CYP1C1 and CYP1A in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced carcinogenesis. *Aquat Toxicol.* **99**(4): 439–447.

Wills, LP; Jung, D; Koehn, K; Zhu, S; Willett, KL; Hinton, DE; Di Giulio, RT. 2010. Comparative chronic liver toxicity of benzo[a]pyrene in two populations of the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different exposure histories. *Environ Health Perspect.* **118**(10):1376–81.

Winzer, K; van Noorden, CJ; Köhler, A. 2002. Sex-specific biotransformation and detoxification after xenobiotic exposure of primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L). *Aquat Toxicol.* **59**(1–2): 17–33.

Yeh, GC; Lopaczynska, J; Poore, CM; Phang, JM. 1992. A new functional role for P-glycoprotein: efflux pump for benzo(alpha)pyrene in human breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Res.* **52**(23): 6692–5.

Zaja, R; Lončar, J; Popovic, M; Smital, T. 2011. First characterization of fish P-glycoprotein (abcb1) substrate specificity using determinations of its ATPase activity and calcein-AM assay with PLHC-1/dox cell line. *Aquat Toxicol.* **103**(1–2): 53–62.

Zaja, R; Munić, V; Klobucar, RS; Ambriović-Ristov, A; Smital, T. 2008. Cloning and molecular characterization of apical efflux transporters (ABCB1, ABCB11 and ABCC2) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol.* **90**(4): 322–32.

Zhou B., Liu C., Wang J., Lamb P., Wu R., 2006. Primary cultured cells as sensitive in vitro model for assessment of toxicants—comparison to hepatocytes and gill epithelia. *Aquat Toxicol.* **80**: 109–118.

Zucchi, S; Corsi, I; Luckenbach, T; Bard, SM; Regoli, F; Focardi, S. 2010. Identification of five partial ABC genes in the liver of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and sensitivity of ABCB1 and ABCC2 to Cd exposure. *Environ Pollut.* **158**(8): 2746–56.